

---

INTÉRÊT DE L'UTILISATION DES SOURIS TRANSGÉNIQUES DANS L'ÉTUDE  
DES ESST  
(Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles)

---

**THÈSE**

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE  
DIPLÔME D'ÉTAT

Par

**Frédéric STIEGLER**

---

**À Monsieur le Professeur Pasquier,**

*Professeur des Universités, Virologie,*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
hommages très respectueux.

**À Madame le Docteur Messud-Petit,**

*Maître de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
Pathologie infectieuse,*

Qui nous a fait l'honneur de nous confier ce travail et de le diriger,  
qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

**À Monsieur le Docteur Bertagnoli,**

*Maître de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
Virologie,*

Qui a accepté de participer à notre jury de thèse,  
qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

À John

Pour ma famille ...  
Pour mes amis ...

... Prions ...

## Table des matières

Introduction .....	3
Première partie : Généralités sur les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës	
Transmissibles .....	4
I. Caractères généraux .....	4
II. Les ESST humaines .....	5
A. La maladie de Creutzfeldt-Jakob.....	5
B. Le kuru .....	8
C. Le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS).....	9
D. L'insomnie fatale familiale .....	9
III. Les ESST animales.....	10
A. La tremblante des ovins et des caprins.....	10
B. L'encéphalopathie transmissible du vison (TME pour transmissible mink encephalopathy) .....	12
C. L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) .....	12
D. Autres maladies à prions animales .....	14
IV. Propriétés de l'agent infectieux.....	16
A. Caractères physico-chimiques de l'ATNC.....	16
B. Notion de prion.....	21
C. Pathogénie .....	28
Deuxième partie : Données sur la transgénèse.....	
I. Les différentes méthodes de transfert de gènes chez la souris.....	33
A. La micro-injection .....	33
B. L'infection rétrovirale .....	34
C. L'utilisation de cellules embryonnaires totipotentes (cellules ES) .....	35
II. Potentialité de la transgénèse.....	38
A. Le franchissement de la barrière d'espèce et de la barrière tissulaire .....	38
B. Variations quantitatives de l'expression d'un gène.....	38
C. Remaniements chromosomiques.....	39
Troisième partie : Utilisation de l'outil transgénique dans l'étude des ESST .....	
I. Apports sur la nature et la structure du prion.....	41
A. Preuves transgéniques du « protéin only ».....	41
B. Apports sur la structure du prion.....	45
II. Apports sur la pathogénie .....	47
A. Contrôle de la longueur du temps d'incubation. ....	47
B. Barrière d'espèce.....	48
C. La protéine X.....	50
D. Distribution du prion au cours de l'infection .....	53
E. Expression ectopique de PrP chez des souris transgéniques <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> .....	54
III. Apports sur des maladies particulières.....	56

A. Étude transgénique des maladies à prion humaines héréditaires .....	56
B. Étude transgénique de l'ESB.....	58
C. Preuves transgéniques de la transmission de l'ESB à l'homme.....	59
Conclusion.....	63
Bibliographie.....	64
Tableaux.....	71
Figures.....	72

## Introduction

La fin du dernier siècle a vu l'émergence d'un nouveau type de maladies du système nerveux qui laissa longtemps la communauté scientifique dans l'expectative du fait des particularités de son agent pathogène. On regroupe l'ensemble de ces maladies sous le terme d'encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST). C'est avec la médiatique maladie de « la vache folle » et son important risque de zoonose, que les recherches se sont rapidement intensifiées. On arriva ainsi à diverses hypothèses sur l'identité de l'agent de nature essentiellement protéique, mais les outils classiques d'exploration cellulaire ne permirent pas de les vérifier. C'est l'avancée dans les techniques de transgénèse et en particulier la fabrication de souris « knock-out » qui permit aux chercheurs de progresser dans l'étude de ces maladies.

Après avoir décrit les différentes ESST et ce que les moyens classiques d'études avaient permis d'en étudier, nous présenterons les différentes techniques de transgénèse, avant de nous attacher à l'étude des principaux résultats connus grâce aux souris transgéniques, dans la connaissance de ces maladies.

## **Première partie : Généralités sur les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles**

Au cours des dernières décennies on a pu mettre en évidence de nombreuses maladies affectant le système nerveux, dont la pathogénie déroge aux mécanismes des maladies classiques infectieuses. Ces pathologies affectent un grand nombre d'espèces de Mammifères allant de la souris à l'homme, et leur étiologie continue de dérouter les scientifiques. C'est un vétérinaire islandais, Bjorn Sigurdsson, qui en 1954 parla le premier de « virus lent » au cours de ses travaux sur la tremblante du mouton [131]. En 1992 Stanley B. Prusiner émet l'hypothèse du « prion » [111], concept pour lequel il reçoit le Prix Nobel de Médecine en 1997.

Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire les différentes maladies qui ont été rencontrées chez l'homme ou l'animal, ainsi que les diverses hypothèses qui ont pu être émises concernant leur étiologie.

### **I. Caractères généraux**

Toutes ces maladies sont des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST). En effet on retrouve toujours quatre caractères récurrents :

-encéphalopathie : c'est toujours le système nerveux central qui est affecté avec des symptômes d'ordre nerveux. Ils sont d'abord frustes avec par exemple perte de mémoire chez l'homme, trouble du comportement chez les animaux ; puis une évolution assez rapide de quelques semaines à quelques mois, qui après une phase d'ataxie avec hyperesthésie voire démence chez l'homme, conduit inexorablement à la mort ;

-spongiforme : au niveau anatomo-pathologique, on retrouve toujours une dégénérescence neuronale avec une vacuolisation du neuropile (appelée spongiose) et parfois accumulation de plaques amyloïdes. Les régions du système nerveux central atteintes varient selon les pathologies ;

-subaiguë : l'évolution de la maladie est toujours lente avec en particulier une phase d'incubation longue allant de quelques mois à plusieurs années ;

-transmissible : de nombreuses études ont montré que la quasi-totalité de ces pathologies étaient transmissibles aux animaux de laboratoire (surtout rongeurs ou primates).



Cette transmissibilité est possible par voie orale, sous-cutanée, intra-musculaire, intra-veineuse et intra-cérébrale. C'est cette voie qui est la plus efficace et c'est surtout celle dont les phases d'incubation sont en général les plus courtes. Pour des gains de temps, c'est donc celle qui est la plus utilisée. Il faut noter que ces temps d'incubation restent encore assez longs, surtout lors de la première transmission inter-espèce. On parle de barrière interspécifique. Après plusieurs passages sur des lots successifs de souris, on obtient des délais d'incubation réduits (par exemple, pour le cas de la tremblante, de l'ordre de quatre à cinq mois [34]). Il est même possible d'induire une encéphalopathie chez le hamster doré de Syrie (SHa) dans un délai de 70 jours seulement [70, 83].

Il a aussi été démontré qu'il existait une relation linéaire entre le temps d'incubation et la dose infectieuse, ce qui a permis de monter des expérimentations sur seulement quatre animaux au lieu des 60 requis auparavant [112].

À ces quatre caractères, il faut ajouter que l'on retrouve toujours une absence d'inflammation ainsi que de toute réponse immunologique détectable.

## **II. Les ESST humaines**

On retrouve quatre grands types : la maladie de Creutzfeldt-Jakob, le kuru, le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker et l'insomnie fatale familiale.

### **A. La maladie de Creutzfeldt-Jakob**

Elle fut décrite dès le début du siècle dernier par Creutzfeldt et Jakob [117] mais ce n'est que dans les années 60 que l'on a montré le caractère spongiforme de cette maladie, et que l'on a envisagé sa transmissibilité [76].

Il s'agit d'une affection rare, de répartition mondiale et dont l'incidence est estimée à un cas par million d'habitants et par an. Cliniquement, on a tout d'abord une phase prodromique aspécifique (asthénie, amaigrissement, troubles du sommeil). Ces prodromes sont généralement suivis par une phase démentielle ; on peut aussi avoir des signes cérébelleux ou visuels dominants. Cette phase d'état évolue toujours vers un état démentiel associé à des myoclonies. L'évolution, toujours mortelle, se déroule sur une durée moyenne de quatre mois.

Sur le plan lésionnel, on trouve des pertes neuronales, une prolifération astrocytaire et des vacuoles au niveau du neuropile. Par contre les plaques amyloïdes sont rares (10 à 15 % des cas)

On distingue quatre formes de MCJ classées selon leurs circonstances d'apparition :

- La maladie de Creutzfeldt-Jakob sporadique (sMCJ) :

La forme sporadique de la maladie représente environ 85 % des cas de MCJ. L'apparition de la maladie est toujours spontanée chez des sujets âgés (60 ans en moyenne) et d'évolution relativement rapide (4 à 8 mois selon les études) [19, 20]. Les signes cliniques sont les signes classiques des MCJ c'est-à-dire une démence avec myoclonies et un dysfonctionnement cérébelleux. Des études épidémiologiques rétrospectives ont tenté de définir des facteurs communs aux cas sporadiques. Les résultats n'ont pas montré de fréquence plus élevée dans les régions d'élevage mais, par contre, une augmentation en fonction de la densité de population. Il n'est pas ressorti de ces études l'existence de professions « à risque » [154].

- La maladie de Creutzfeldt-Jakob d'origine familiale (fMCJ) :

Les cas familiaux représentent 5 à 15 % des cas de MCJ. Historiquement il fut constaté qu'il existait quelques régions où la MCJ avait une incidence anormalement élevée, notamment parmi les populations juives d'origine libyenne. On a d'abord mis cette incidence importante en relation avec la consommation d'yeux de mouton par ces populations ; mais en fait, il semblerait plutôt qu'elle soit liée à l'existence de cas familiaux [75]. De nombreux cas ont ensuite été identifiés sur tous les continents.

Dans les familles touchées, la maladie prend un caractère héréditaire et le mode de transmission semble être autosomique dominant. On retrouve trois lignées de fMCJ qui correspondent à trois mutations différentes. Les signes cliniques sont comparables à ceux de la sMCJ, mais ils apparaissent chez des sujets plus jeunes (45 à 55 ans de moyenne selon les types) et la durée d'évolution en est sensiblement plus longue (jusqu'à 50 mois) [21, 94, 85].

- La maladie de Creutzfeldt-Jakob d'origine iatrogène (iMCJ) :

La nature transmissible de la MCJ fut décrite dès 1968 chez un chimpanzé après une inoculation intra-cérébrale d'extraits biopsiques provenant du cerveau d'un patient atteint de MCJ [56]. Bien que possible, la transmission d'homme à homme ne fut pas rapportée avant 1974, date à laquelle Duffy décrivit un patient âgé de 55 ans qui développa une MCJ 18 mois après avoir reçu un greffon de cornée provenant d'un donneur atteint de MCJ [48].

On a pu ensuite rencontrer d'autres modes de contamination iatrogène : les électrodes intracérébrales [8], les instruments chirurgicaux [159], les gonadotropines issues de glande

pituitaire de patients décédés de MCJ [37], les hormones de croissance produites à partir d'hypophyse de patients décédés de MCJ [31] et les greffes de dure-mère [32, 141]. L'âge d'apparition des symptômes dépend de l'âge de contamination, mais globalement on retrouve des patients beaucoup plus jeunes que pour des MCJ classiques.

Par exemple pour la iMCJ associée à l'injection d'hormone de croissance (c'est la plus répandue), l'âge moyen est de 30 ans. Les symptômes sont comparables à ceux des autres MCJ avec en début d'évolution des anomalies de démarche ainsi qu'une ataxie. De plus, au niveau histologique, on retrouve fréquemment des plaques amyloïdes.

- Variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) :

Le premier cas de ce nouveau type de MCJ a été décrit en Angleterre en 1994. Depuis, on en a recensé en Angleterre (au 3 février 2003), 122 cas décédés et 8 cas survivants (source : site internet du « Department of Health », Monthly Creutzfeldt-Jakob Disease Statistics - [www.doh.gov.uk/cjd/stats/feb03.htm](http://www.doh.gov.uk/cjd/stats/feb03.htm)). En France, seuls trois cas ont jusqu'ici été identifiés. Cette pathologie touche des patients plus jeunes, voire des adolescents. L'âge moyen des malades est d'environ 28 ans [160]. La coïncidence géographique et chronologique de la vMCJ et de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), touchant les bovins essentiellement en Angleterre, ainsi qu'à un degré moindre en France, a rapidement fait penser que la contamination serait due à l'ingestion d'éléments contaminants d'origine bovine. En effet depuis 1987 l'essentiel des cas d'ESB rencontrés dans le monde l'ont été en Europe de l'Ouest et quasi exclusivement au Royaume-Uni. Au 30 Septembre 2002 les statistiques cumulées donnaient un total de cas d'ESB déclarés de 182 779 pour le Royaume-Uni contre seulement 4 810 pour le reste de l'Europe (source Defra). L'évolution de la maladie se déroule sur une moyenne de seize mois. On observe généralement chez les patients d'abord des prodromes d'ordre psychiatrique suivis de paresthésie ou de dysesthésie. Les signes neurologiques des MCJ classiques apparaissent ensuite tardivement. Anatomopathologiquement, on retrouve surtout des plaques amyloïdes entourées de vacuoles (appelées plaques « florides ») caractéristiques, ainsi que des lésions neuronales des MCJ classiques avec une localisation spécifique au niveau du ganglion basal et du thalamus.

## B. Le kuru

C'est la première ESST humaine découverte. Gadjusek a parfaitement étudié cette affection aussi bien d'un point de vue épidémiologique que clinique. Il semblerait que cette maladie soit apparue vers 1900 en Nouvelle-Guinée mais ce n'est qu'en 1957 que Zigas et Gadjusek l'ont décrite chez les membres de la tribu Foré.

Le tableau clinique est précédé de prodromes non spécifiques (malaises, céphalées, arthralgies). Ensuite, la phase d'état est caractérisée par une atteinte cérébelleuse ataxique ; les signes démentiels sont rares et il n'y a pas de myoclonie. L'évolution est toujours fatale, avec une durée moyenne de douze mois [55].

Au plan histologique on observe une gliose, une dégénérescence neuronale avec vacuolisation, une spongiose au niveau du neuropile et un dépôt de plaques amyloïdes.

Ces lésions se localisent principalement dans le cortex et en particulier au niveau du cervelet.

L'évolution du kuru au sein de la population était liée à l'existence d'un cannibalisme rituel. En effet, chez les peuplades où sévissait le kuru, il existait une coutume mortuaire au cours de laquelle les femmes et les enfants préparaient les cadavres de leurs proches décédés et consommaient plutôt les viscères et le cerveau, les hommes se réservant les meilleurs morceaux (muscles).

Cette hypothèse est confirmée par deux faits :

- les individus touchés étaient essentiellement des femmes et des enfants.
- après l'arrêt du cannibalisme, l'incidence de cette affection a rapidement décru [75].

Il s'agit d'une maladie transmissible comme l'a montré la transmission expérimentale au singe par voie orale et parentérale [54].

La principale hypothèse pouvant expliquer l'existence et le développement du kuru serait l'apparition de cas sporadiques de maladie de Creutzfeldt-Jakob au sein de cette population

qui, compte tenu du cannibalisme, aurait abouti au maintien et à l'extension de cette affection sous une forme quelque peu différente.

#### C. Le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS).

Cette affection est rare mais très intéressante car elle est héréditaire. Le mode de transmission est autosomique dominant.

Selon les types de la maladie, les patients sont âgés en moyenne de 40 à 50 ans et la maladie évolue sur une longue période d'au moins 3 ans [5].

L'expression clinique dominante est une ataxie cérébelleuse avec une démence en phase terminale. L'évolution se fait en général sur cinq ans [76].

Sur le plan histologique, on retrouve une perte neuronale accompagnée d'une dégénérescence des voies spino-cérébelleuses et cortico-spinales (que l'on ne rencontre ni dans le kuru, ni dans les diverses formes de MCJ). Une gliose et des plaques amyloïdes sont également présentes. L'état spongiforme est variable et inconstant.

Cette affection est transmissible, et ce d'autant plus facilement que l'état spongiforme est important [3, 64].

#### D. L'insomnie fatale familiale

Depuis 1939, un type de patients atteints de démence sévère et de lésions dégénératives symétriques caractéristiques au niveau du thalamus, avait été décrit [133], mais c'est seulement en 1986 que Lugaresi et ses collaborateurs ont identifié la maladie et l'ont nommée « Insomnie fatale familiale ». On retrouve là encore, une maladie héréditaire avec un mode de transmission autosomique dominant [82]. C'est une maladie extrêmement rare (jusqu'en 1999, seules 24 familles porteuses ont été isolées dans le monde [5]). Cliniquement, la maladie touche des patients âgés en moyenne de 49 ans et évolue sur une année avec des symptômes commençant par des troubles sévères du sommeil (type insomnie) associés à un dysfonctionnement de plus en plus important du système nerveux autonome (hyperthermie, tachycardie, hypertension...). Histologiquement, on retrouve surtout des lésions dégénératives au niveau du thalamus.

### III. Les ESST animales

#### A. La tremblante des ovins et des caprins

C'est certainement la mieux connue des maladies à prions car elle a fait l'objet de nombreuses recherches [109] et ce depuis longtemps.

La tremblante sévit depuis le début du XVIIIe siècle ; on la connaissait alors surtout en Grande-Bretagne où elle évoluait sur un mode enzootique [124].

Le mouton est plus sensible que la chèvre à cette affection. Les animaux atteints sont âgés de trois à quatre ans avec un minimum de dix à douze mois. Il a été noté une diminution de la durée d'incubation, c'est-à-dire un abaissement de l'âge d'apparition des symptômes avec l'augmentation de l'incidence au sein d'un troupeau donné ; ce phénomène pourrait être lié à une augmentation de la pression d'infection [29].

Au plan mondial, la maladie est largement répandue. La Nouvelle-Zélande et l'Australie semblent en être indemnes. En France, il est difficile de se faire une idée sur sa répartition géographique, mais il est vraisemblable qu'elle se superpose avec celle de l'élevage ovin. Cependant, compte tenu de l'élimination rapide des animaux par les éleveurs, la fréquence réelle est certainement sous-estimée. En Grande-Bretagne, la proportion de troupeaux de plus de cent brebis atteints ou ayant été atteints de tremblante est de 30 %.

À l'échelle de l'exploitation, l'incidence annuelle est faible (0.5 à 2 %) dans un premier temps. Les cas semblent d'abord sporadiques, mais si l'infection se maintient, peu à peu l'incidence augmente et peut même atteindre 10 %.

Sur un plan clinique, après une période d'incubation toujours longue, on observe une phase prodromique de troubles du comportement souvent discrète. La phase clinique proprement dite correspond à l'apparition des symptômes nerveux : prurit, hyperesthésie et ataxie cérébelleuse. L'évolution de la maladie aboutit toujours à la mort de l'animal dans un état de cachexie avancée malgré la conservation de l'appétit [124].

L'évolution se déroule en deux semaines à six mois, avec une moyenne de un à deux mois.

L'examen histologique conduit la plupart du temps à un diagnostic de certitude. Les lésions observées sont non-inflammatoires et symétriques. On note principalement une dégénérescence et une vacuolisation des neurones, une astroglie et une spongiose du neuropile. On trouve également de façon moins constante la présence de plaques amyloïdes. Chez les ovins, la lésion la plus caractéristique est certainement la vacuolisation neuronale due à la présence de vacuoles dites en « bulles de savon » dans le protoplasme de certains neurones.

La transmissibilité de la tremblante a été démontrée par Cuillé et Chelle en 1938 [44]. Ce sont eux qui, la même année, ont démontré le caractère « filtrable » de l'agent. Dans les conditions naturelles, la maladie n'est que très lentement contagieuse ; la contagion peut être alors horizontale ou verticale. La période la plus sensible pour la transmission de la maladie est la période péri-partum. En effet on a démontré la présence de l'agent dans les enveloppes et les tissus fœtaux, les sécrétions nasales et pharyngées. Lors de la mise-bas de brebis infectées, le placenta est une véritable « bombe à prions » capable de contaminer l'environnement. Des expériences récentes indiquent cependant que la contamination des agneaux se fait après la mise-bas par têtée de mamelles souillées [1].

La contagion horizontale est aussi possible. Elle pourrait se faire à partir de matières virulentes (jetage, salive, liquide et enveloppes fœtales). En considérant la longueur importante de la période d'incubation, pour que la transmission puisse s'exprimer cliniquement, il faut que l'animal contaminé soit jeune.

Ainsi, quel que soit le mode de transmission envisagé, la période critique est l'agnelage car elle correspond à la présence de matières virulentes et d'animaux nouveaux-nés sensibles [35].

La plupart des cas existants chez la chèvre proviennent d'élevages où cohabitent ovins et caprins. Notons aussi que le mouflon semble naturellement sensible à la tremblante.

La transmission et la sensibilité sont en grande partie génétiques. Cela a été rapidement mis en évidence par l'existence de races plus sensibles que d'autres. En effet certaines lignées de mouton sont résistantes à la maladie. Il y a en ce moment en France une campagne de

sélection génétique sur le cheptel Français visant à ne garder que les reproducteurs porteurs de l'allèle de résistance (ARR) à la Tremblante [90, 95].

#### B. L'encéphalopathie transmissible du vison (TME pour transmissible mink encephalopathy)

Cette affection est rare. Elle sévit dans les élevages de visons et a surtout été décrite aux États-Unis où elle apparut en 1947 [75].

La TME est une affection sporadique, mais une fois établie dans un élevage, elle revêt un caractère enzootique ; 10 à 100 % des reproducteurs peuvent être atteints [116].

Après une période d'incubation de sept à douze mois, les symptômes nerveux apparaissent. Dans les premiers temps, on note une hyperesthésie et des troubles du comportement (agressivité, modification des lieux de défécation). Suivent une ataxie locomotrice et un état de somnolence d'autant plus évidents qu'ils succèdent à l'hyper-excitation initiale. En phase terminale, une agressivité incontrôlée avec automutilation est fréquente. La maladie est toujours mortelle en deux à sept semaines.

Les lésions histologiques décrites sont une vacuolisation du neuropile, une dégénérescence neuronale et une astrocytose. L'aspect lésionnel le plus caractéristique est certainement l'aspect spongiforme avec de petites vacuoles rondes.

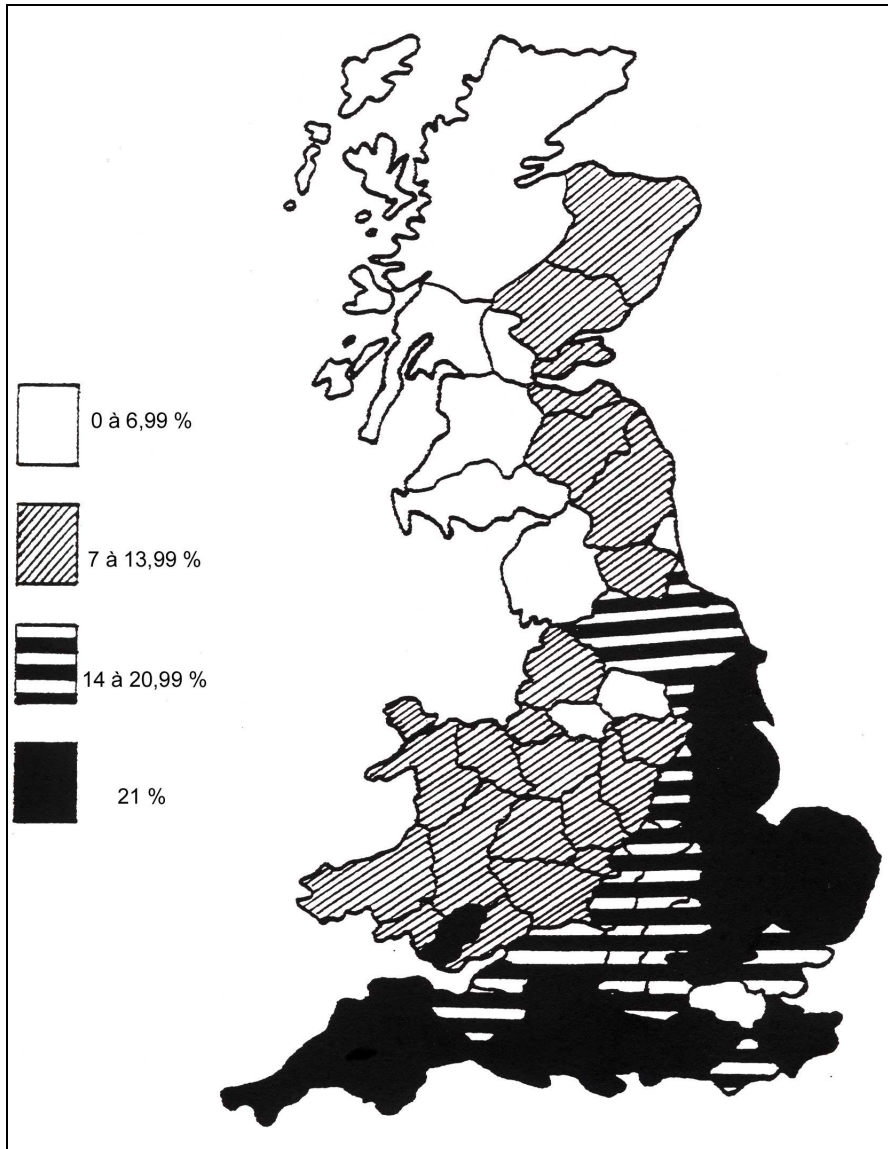
Des études sur les causes de l'émergence de cette affection ont démontré le rôle d'aliments contaminés. Il s'agit d'une anazootie. Le fait que ce petit carnivore est alimenté en élevage avec des carcasses bovines ou ovines laisse à penser que la TME est issue de la tremblante ou de l'ESB.

#### C. L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB)

Cette pathologie touche l'élevage bovin et surtout laitier. Les premiers cas ont été décrits et confirmés en 1986 [148] en Grande-Bretagne surtout dans le Sud et dans l'Est (Fig. 1). Depuis, l'incidence annuelle de l'épizootie, d'abord faible (130 cas en 1987), a progressivement augmenté jusqu'en 1993 (près de 40 000 cas déclarés) et depuis cette date le nombre de cas diminue lentement. La maladie s'est ensuite déclarée dans de nombreuses



régions du monde, d'abord en Europe puis au Canada et récemment le Japon a déclaré son premier cas. Dans tous ces pays, l'épizootie a cependant connu un degré bien moindre qu'au Royaume-Uni (1 174 cas en 2001 et depuis 1987 un total de 182 779 cas déclarés au 30 Septembre 2002 (source Defra).



**Fig. 1. [156]** Pourcentage de troupeaux laitiers ayant présenté au moins un cas d'ESB de 1986 à 1990.

Cette affection touchait au départ des animaux âgés en moyenne de 3 à 6 ans ; actuellement, l'arrêt de la contamination entraîne une augmentation de l'âge moyen. Au niveau clinique, la maladie débute toujours discrètement par un changement de comportement. Puis, progressivement, ces troubles s'aggravent et sont peu à peu associés à des problèmes locomoteurs, une hyperesthésie ainsi qu'une agressivité importante. La maladie évolue lentement de manière apyrétique en trois semaines à six mois vers un décubitus permanent conduisant inexorablement à la mort [132].

Au niveau anatomo-pathologique, on retrouve une dégénérescence neuronale avec une vacuolisation importante du neuropile ainsi que le dépôt de plaques amyloïdes.

La coïncidence épidémiologique entre les cas d'ESB et l'utilisation de farine de viande et d'os (FVO) évoque une origine de la maladie plutôt ovine. Un changement dans le mode de préparation des FVO (l'abandon de l'extraction des corps gras par solvant organique) aurait permis à l'agent infectieux de la tremblante de survivre et de contaminer les bovins [155].

#### D. Autres maladies à prions animales

On a recensé certaines pathologies ayant pour origine soit les FVO contaminées ou bien même des tissus bovins contaminés. Par exemple l'encéphalopathie spongiforme féline (FSE) qui affecte le chat, l'encéphalopathie des ongulés exotiques qui atteint des animaux tel l'oryx ou le nyala et la maladie du dépérissement chronique chez les cervidés nord-américains.

À cela il faut ajouter toutes les pathologies que l'on a pu voir se développer chez une grande diversité d'animaux de laboratoire après inoculation orale, parentérale ou intracérébrale.

Au bilan, on retrouve donc un ensemble de maladies affectant le système nerveux d'un grand éventail d'espèces de mammifères ayant pour principal point commun la possible transmissibilité intra comme inter-spécifique. Elles possèdent toutes un agent infectieux qui jusqu'il y a une dizaine d'années avait laissé perplexes la communauté scientifique. C'est en étudiant les propriétés et la nature de cet agent particulier que les connaissances sur les ESST ont pu progresser.

MALADIES	HOTE	MECANISME DE PATHOGENESE
Kuru	Population Fore	Contamination par cannibalisme rituel
iMCJ	Humains	Infection par hormone de croissance contaminée, greffe de cornée, etc.
vMCJ	Humains	Contamination par prions bovins ?
fMCJ	Humains	Mutation dans la lignée germinale du gène du prion
GSS	Humains	Mutation dans la lignée germinale du gène du prion
FFI	Humains	Mutation dans la lignée germinale du gène du prion (D178N, M129 )
sMCJ	Humains	Mutation somatique ou conversion spontanée de PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> ?
FSI	Humains	Mutation somatique ou conversion spontanée de PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> ?
Tremblante	Ovins et Caprins	Infection d'animaux génétiquement sensibles
ESB	Bovins	Infection par des FVO contaminés
TME	Visons	Infection par des prions d'origine ovine ou bovine ?
FSE	Chats	Infection par des tissus bovins ou des FVO contaminés
Encéphalopathie des Ongulés exotiques	Nyala, Oryx, etc.	Infection par des FVO contaminés

**Tableau I : Les différentes ESST**

## IV. Propriétés de l'agent infectieux

Ce type de maladies soulève un problème de biologie fondamentale sur la nature de l'agent et la pathogénie. Ses propriétés inhabituelles l'ont défini comme un « agent transmissible non conventionnel » ou ATNC.

### A. Caractères physico-chimiques de l'ATNC

Dès les premiers travaux, les propriétés des agents responsables des encéphalopathies spongiformes se sont révélées très différentes de ce que l'on connaissait jusqu'alors.

#### 1. Filtrabilité, densité

La filtrabilité des ATNC les a fait classer initialement parmi les virus. L'agent de la tremblante est filtrable à travers une membrane dont les pores mesurent 25nm de diamètre. En revanche celui du kuru ou de la MCJ n'est filtrable qu'à travers des pores de 100nm [55].

À partir d'une série de centrifugations différentielles d'extraits provenant de rates de souris infectées, l'étude du profil de sédimentation de l'agent de la tremblante a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs particules dont le coefficient de sédimentation varie de 60S à 1 000S.

L'hétérogénéité en taille, densité et charge électrique suggère la présence de protéines à la surface de ces particules.

#### 2. Résistance aux agents physiques

La résistance de l'agent transmissible est une des propriétés clés. Cette faculté à résister à de nombreux agents physiques et chimiques est primordiale en matière d'épidémiologie.

La résistance de l'ATNC aux agents physiques est résumée dans le tableau II :

AGENT	MODALITES	EFFET
Chaleur humide	100°C, 30 mn	Aucun
	100°C, quelques heures	Diminution moyenne du titre infectieux
	120°C, 1 heure	Forte diminution du titre infectieux
	136°C, 30 mn	Inactivation
Froid	-70°C, plusieurs années	Conservation
Ultra-violets	5-10 ergs/mm <sup>2</sup> à 254 nm	Résiste
	5-10 ergs/mm <sup>2</sup> à 237 nm	Inactivation partielle

Tableau II : Résistance aux agents physiques de l'ATNC [84]

○ *Température*

La résistance à la température est très importante ; l'agent résiste une heure à 121°C en chaleur humide et 24 heures à 160°C en chaleur sèche.

Les normes de décontamination pour la prévention de la transmission iatrogène de la MCJ sont un passage d'une heure à l'autoclave à 132°C ou 18 minutes à 134-138°C [88].

Le froid n'a aucune action sur l'agent [23, 101].

○ *Rayonnements*

L'ATNC est très peu sensible aux rayons ionisants et aux ultra-violets [55].

- Ultra-violet : L'agent résiste à 5-10 erg/mm<sup>2</sup> à 254nm ; par contre, il est partiellement inactivé à 5-10 erg /mm<sup>2</sup> à 237nm, ce qui correspond à un spectre d'inactivation atypique.

On estime que l'action des UV à 237nm est six fois supérieure à celle des UV à 254nm (longueur d'onde inactivant les acides nucléiques).

- Rayons ionisants : L'action des rayons ionisants sur les ATNC est peu efficace. En effet, ils résistent à des expositions dépassant 4.3.10<sup>2</sup> rad.

#### ○ *Ultrasons*

Les ultrasons n'ont aucun effet sur les agents transmissibles [88].

D'une manière générale, on ne connaît actuellement aucune entité infectieuse « traditionnelle » qui soit physiquement aussi résistante que les ATNC.

### 3. Résistance aux agents chimiques

La résistance de l'ATNC aux agressions chimiques est à la hauteur de ce que l'on a rencontré pour les agents physiques.

Le tableau III récapitule les principales caractéristiques de la résistance aux agents chimiques des ATNC.

#### ○ *pH*

La zone de stabilité acido-basique des ATNC est très étendue. L'agent est stable de pH=2 à pH=10.

#### ○ *Désinfectants usuels*

Aucune décontamination totale ne peut être obtenue en utilisant les désinfectants usuels. Par exemple l'hypochlorite de soude à 0,5 % ne permet de noter qu'une faible diminution du titre du pouvoir infectieux [123].

AGENT	MODALITÉS	EFFET
pH	2 à 10	aucun
Formol	10%, 28 mois	Aucun
	0,25 à 20%, 18 h à 37°C	Aucun
Chloroforme	5%, 13 jours	Aucun
Périodate sodique	0,01 M à pH 3,6, 4 heures	Forte diminution du titre infectieux
Permanganate de potassium	0,1%, 24 h à 22°C	Faible diminution du titre infectieux
Hypochlorite de soude	0,5%, 15 mn à 24 h à 22°C	Faible diminution du titre infectieux
Phénol	2%, 13 jours	Aucun
	50 à 90% en solution aqueuse	Faible diminution du titre infectieux
Sodium Dodécyl Sulfate	5%, 1 heure à 22°C	Faible diminution du titre infectieux
	5%, 1 heure à 37°C	Diminution moyenne du titre infectieux
	Avec mercaptoéthanol	Forte diminution du titre infectieux

Tableau III : Résistance aux agents chimiques de l'ATNC [123]

○ *Détergents*

On constate une grande stabilité face à la plupart des détergents excepté pour le SDS (sodium dodécyl sulfate) et le LDS (lithium dodécyl sulfate).

○ *Modificateurs chimiques des protéines*

On constate une sensibilité des ATNC au :

- DEP (diéthyl pyrocarbonate)
- butanedione
- PMSF ( phényl méthyl sulfanyl fluoride)

○ *Solvants organiques*

Aucune action du méthanol ou de l'éthanol n'a été décrite. Il existe peu de données sur le benzène ou l'hexane mais leur action est supposée faible.

On peut noter cependant une légère action du phénol.

○ *Dénaturant des protéines*

L'ATNC est sensible à l'urée

○ *Ions*

L'agent est stable en présence de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{EDTA}^{4-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Par contre, il est labile en présence de  $\text{Gdn}^+$ ,  $\text{SCN}^-$  (thyocyanate de guanidium) et de  $\text{TCA}^-$  (trichloroacétate).

○ *Enzymes*

La stabilité ou la sensibilité à un type d'enzyme donné a permis de faire de gros progrès sur la connaissance de la structure de l'ATNC.

L'agent est résistant aux nucléases (DNAse et RNAse)

En revanche, on note une sensibilité aux protéinases. L'action de la pronase réduit à 98 % le titre infectieux, mais l'inactivation devient totale lorsque l'on combine son action avec celle du SDS. L'agent est aussi sensible à la trypsine et de façon variable à la protéinase K. Cette



dernière n'est efficace que lors d'une exposition prolongée à une forte concentration (cf. infra).

Concentration en protéinase K	Temps d'exposition	Proportion d'agent détruit
100 µg /ml	1 h	0%
	48 h	96%
500 µg/ml	1 h	52%
	6 h	95%

Tableau IV : Relations entre la concentration en protéinase, le temps d'exposition et la proportion d'agent détruit

On pourra donc, selon le protocole utilisé, hydrolyser l'essentiel des protéines sans pour autant détruire l'ATNC.

## B. Notion de prion

### 1. Conséquences des propriétés physico-chimiques

Par sa grande capacité de résistance à toutes sortes d'agents, ses caractères physiques et sa grande sensibilité aux dénaturants des protéines, surtout aux enzymes protéolytiques (alors qu'il résiste aux nucléases), il paraît évident que le pouvoir infectieux est lié à un agent de nature protéique.

### 2. Purification d'échantillon contenant l'ATNC

Il a rapidement été indispensable, afin de déterminer plus précisément sa structure et de mieux connaître sa biologie moléculaire, d'obtenir des fractions aussi pures que possible.

Afin de réaliser l'enrichissement des échantillons, on a mis à profit ses propriétés physico-chimiques.

Les méthodes actuelles de purification fonctionnent selon un même schéma, bien que des différences existent sur l'intensité de certaines étapes et sur les réactifs utilisés. On procède d'abord à une récolte stérile des encéphales infectés. Les échantillons sont ensuite broyés, homogénéisés et traités par un détergent (le desoxylate). Après centrifugation modérée, l'extrait obtenu subit une digestion enzymatique (nucléase puis protéase). On obtient alors un enrichissement de cent à mille fois la concentration initiale en ATNC.

Après purification, on ne trouve plus dans l'échantillon de façon détectable que des composés de nature protéique ayant gardé pleinement le pouvoir infectieux de l'ATNC.

### 3. Nature de l'ATNC

Avant que l'on démontre qu'un agent de nature uniquement protéique (obtenu par purification) gardait à lui seul un pouvoir pathogène, trois hypothèses s'opposaient sur la nature de l'ATNC (cf. tableau V).

HYPOTHESES	NATURE DE L'AGENT	MODE DE REPLICATION
Prion	Uniquement protéique	?
Virino	Protéine + acide nucléique (protéine codée par l'hôte avec un acide nucléique régulateur)	Acide nucléique du virino comme modèle ou amorce
Virus filamenteux	Protéine + acide nucléique (protéine codée par l'acide nucléique spécifique du virus)	comme pour les virus standards

Tableau V : Les 3 hypothèses sur la structure de l'agent transmissible des ESST. [121]

Les deux premières hypothèses qui furent avancées considéraient un virus ou un virino. Ces particules, contenant des protéines, ont un pouvoir infectieux basé sur un acide nucléique qui est vraisemblablement inexistant dans le substrat obtenu après purification de l'ATNC [6,7,108]. Ces hypothèses ont été rejetées par la majorité des scientifiques ; l'hypothèse du virus n'est cependant pas totalement abandonnée.

L'hypothèse qui s'avère donc la plus vraisemblable est celle du prion. Elle fut proposée par Stanley B. Prusiner (Service de neuropathologie de l'université de Californie, USA). Il

suggéra le terme de prion car il avait affaire à une protéine infectieuse (**proteinaceous and infectious**). Sa définition en est la suivante :

« C'est une petite particule protéique infectieuse qui résiste à l'inactivation par des procédés modifiant les acides nucléiques et dont une protéine anormale, isoforme d'une protéine cellulaire, est un composant majeur et nécessaire. »

La protéine cellulaire est appelée PrP<sup>C</sup> (PrP pour protéine liée au prion et C pour cellulaire) ; elle est naturellement présente dans la membrane à la surface des neurones.

La protéine isoforme anormale est notée PrP<sup>Sc</sup> (Sc pour Scrapie qui signifie Tremblante en anglais, maladie qui a le plus souvent servi de modèle expérimental).

#### 4. Structure du prion

Le prion est résistant aux procédés chimiques ou physiques qui détruisent ou modifient les acides nucléiques alors qu'il est sensible aux traitements dénaturant les protéines. Le rôle fonctionnel et structurel de la protéine du prion serait donc fondamental.

En utilisant des encéphales de hamster de Syrie atteint de tremblante [14, 103], on a pu, après purification et protéolyse limitée, isoler une protéine de poids moléculaire compris entre 27 000 et 30 000 Daltons [4, 105]. Cette protéine désignée PrP<sup>27-30</sup> est une glycoprotéine qui conserve le pouvoir infectieux. Elle correspond à l'isoforme anormale de la PrP<sup>C</sup> de poids moléculaire compris entre 33 000 et 35 000 Daltons, sensible aux protéases. La PrP<sup>Sc</sup> possède le même poids moléculaire que la PrP<sup>C</sup> ; après la protéolyse modérée utilisée dans le protocole de purification, la PrP<sup>Sc</sup> est transformée en PrP<sup>27-30</sup> (fig.2) [15, 33].

Les premières expériences comparant la PrP<sup>C</sup> à la PrP<sup>Sc</sup> ont montré de grandes similitudes entre les deux protéines.

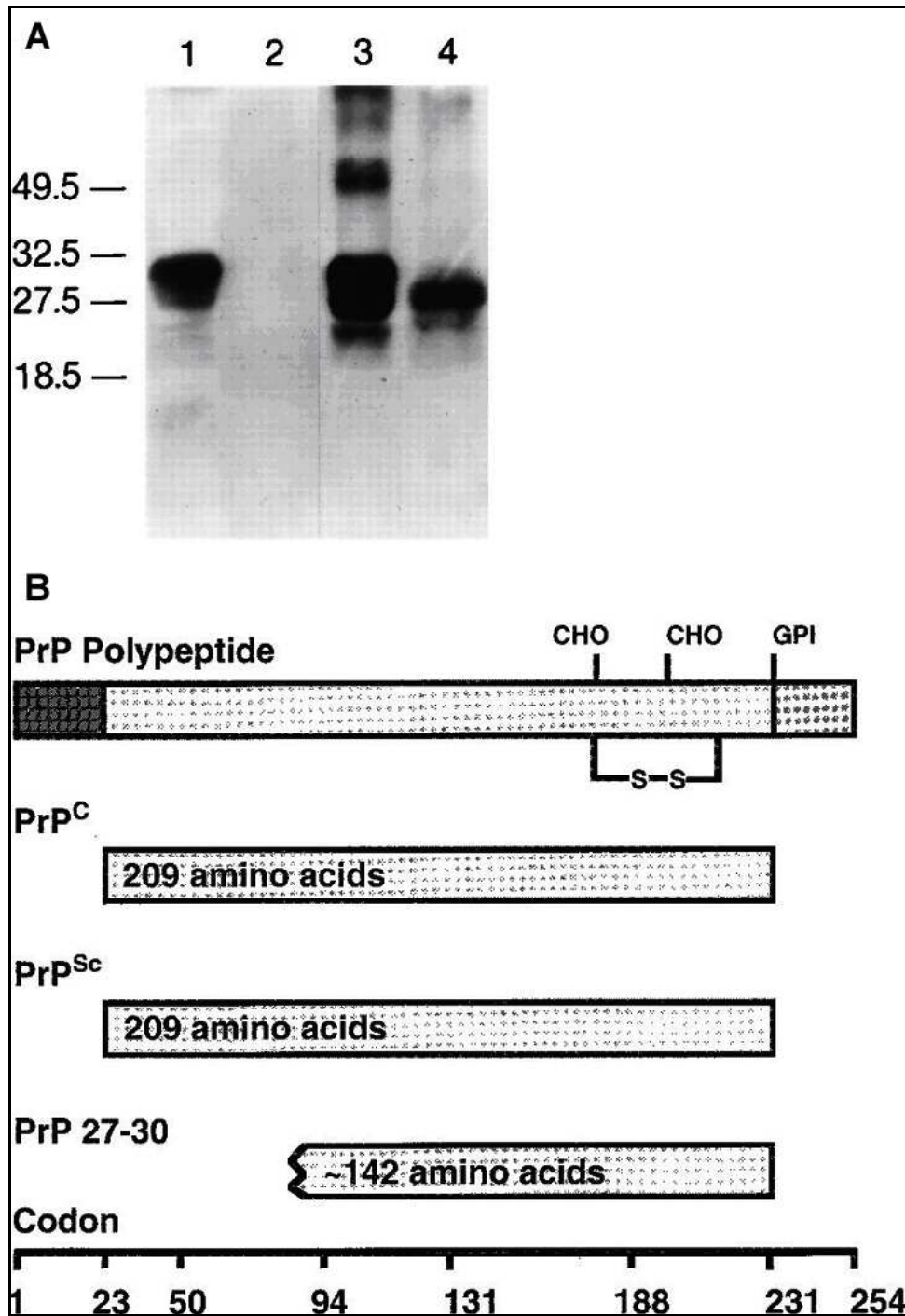
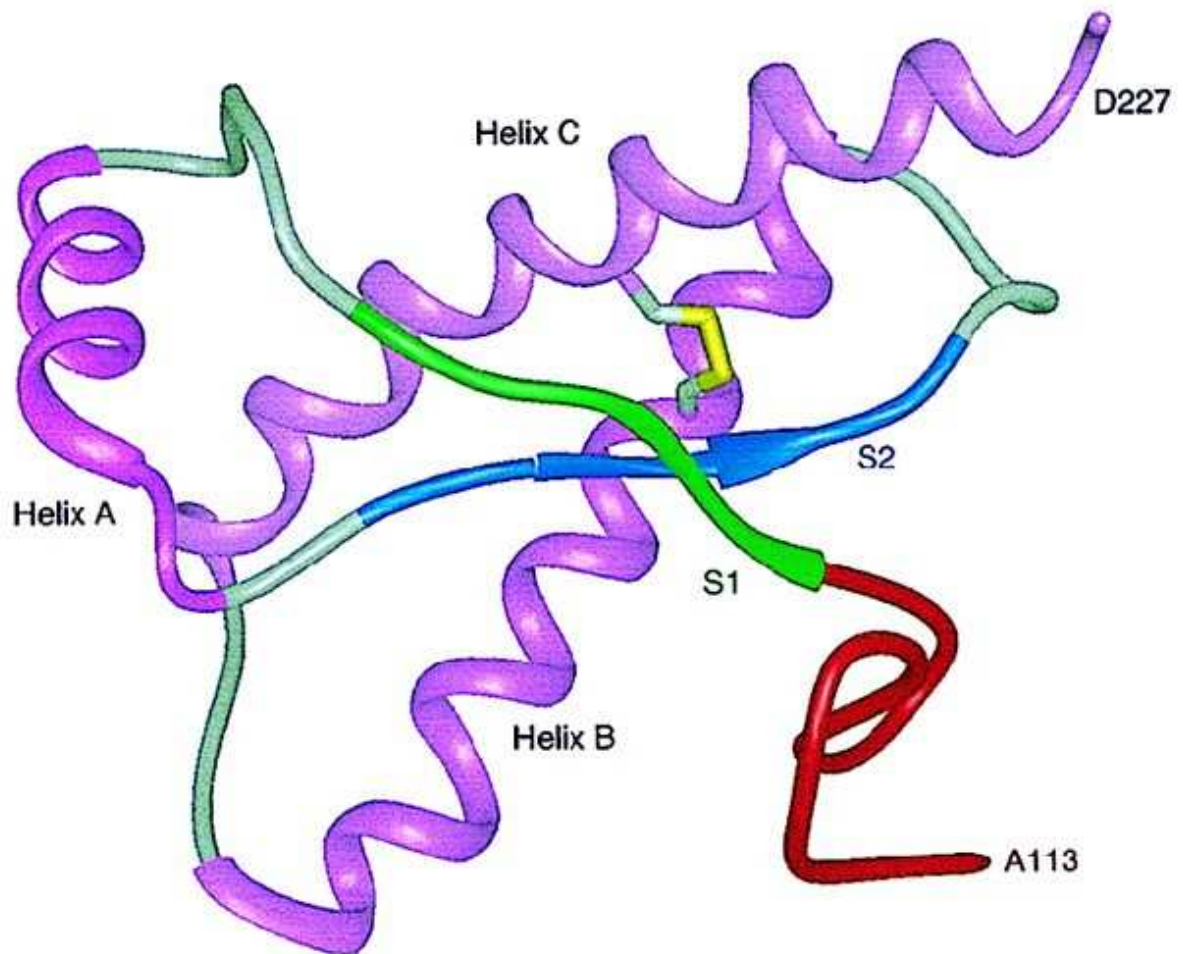


Fig. 2. Les isoformes de la protéine du prion [112].

- A. Western blot d'extraits cérébraux provenant d'hamster sain (lignes 1 et 2) et d'hamster contaminé par des prions (lignes 3 et 4). Les échantillons des lignes 2 et 4 sont hydrolysés par de la protéinase K dosée à  $50\mu\text{g/l}$  pendant 30 mn à  $37^\circ\text{C}$ . La  $\text{PrP}^{\text{C}}$  dans les lignes 2 et 4 est complètement hydrolysée alors que seuls 67 acides aminés sont digérés à partir de l'extrémité  $\text{NH}_2$  de la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  pour former la  $\text{PrP}^{27-30}$ . Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert, les échantillons sont éprouvés avec du sérum d'anticorps de lapin anti-PrP r073. Les poids moléculaires sont exprimés en kilodaltons.
- B. Diagramme en barre de PrP d'hamster de Syrie, constituée de 254 acides aminés. La terminaison  $\text{COOH}$  et le pont glycosylphosphatidylinositol sont indiqués. Après ablation des extrémités  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$ , la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  comme la  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sont constituées de 209 acides aminés. Après une protéolyse modérée, l'extrémité  $\text{NH}_2$  de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  est tronquée pour former la  $\text{PrP}^{27-30}$  composée approximativement de 142 acides aminés

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la PrP<sup>C</sup> reconnaissent aussi la PrP<sup>Sc</sup>. De plus, l'analyse de la séquence en acides aminés ne montre aucune différence entre les deux protéines. Leurs différences seraient donc uniquement conformationnelles. Des études de structure ont montré que la PrP<sup>C</sup> avait une dominante structurelle sous forme d'hélice  $\alpha$  alors que la PrP<sup>Sc</sup> avait une dominante structurelle de type feuillet  $\beta$  [97].

Par résonance magnétique nucléaire (RMN), on a pu, en utilisant un recombinant d'un fragment (90-231) de la protéine du prion d'un hamster de Syrie (rSHaPrP(90-231) produit par *Escherichia coli*, déterminer la structure dans l'espace de la protéine (fig.3). La portion globulaire carboxy-terminale est constituée de trois hélices  $\alpha$  entrecoupées par deux courtes sections qui forment un feuillet  $\beta$ , alors que la région amino-terminale est en grande partie non structurée (fig. 4).



**Fig. 3 [112]** Structure obtenue par RMN d'une PrP(90-231) recombinante de hamster de Syrie.

Il est présumé que la structure  $\alpha$ -héliçoïdale de la rPrP(90-231) ressemble à celle de la PrP<sup>C</sup>. Le code des couleurs est le suivant : hélice  $\alpha$  A,B et C en rose ; pont disulfide entre Cys-179 et Cys-214 en jaune ; le fragment résiduel de région hydrophobe de la PrP composé des résidus 113 à 1265 en rouge ; boucles en gris ; le fragment S1 en vert et le fragment S2 en bleu.

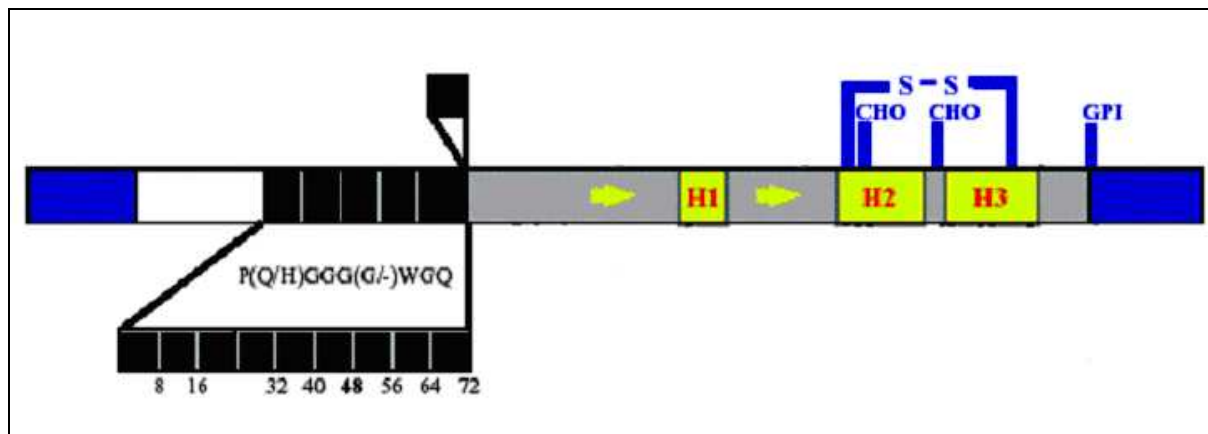
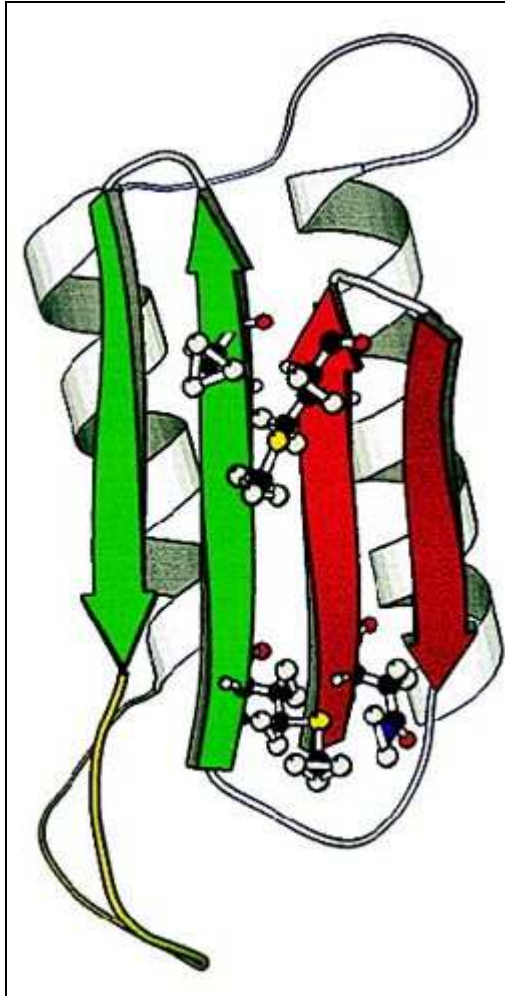


Fig.4. [140] Caractéristique de structure de la protéine du prion.

Le résidu de 253 acides aminés est produit par transcription-traduction du gène de la protéine du prion *prnp* après délétion d'un peptide signal de 22 acides aminés sur la portion  $-NH_2$  et d'un peptide hydrophobe de 23 acides aminés sur la portion  $-COOH$  (montrés en bleu). Un pont glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) est ajouté après la délétion du peptide hydrophobe de 23 acides aminés. Trois hélices  $\alpha$  (H1,H2,H3) et deux courtes sections formant un feuillet plissé  $\beta$  (indiqué par les flèches jaunes) ont été identifiés par Résonance Magnétique Nucléaire après production par *Escherichia coli* d'un recombinant de la protéine du prion. La section  $-NH_2$  terminale qui contient un appariement de cinq octapeptides (montrée en noir) semble être largement non structurée. Des oligosaccharides sont attachés aux résidus 181 et 197 alors qu'un pont disulfure relie les résidus 179 et 214 connectant ainsi les hélices  $\alpha$  H2 et H3. Le clivage par la protéase d'un peptide  $-NH_2$  terminal de 66 acides aminés donne naissance à un noyau protéase-résistant (montré en gris).

De pareilles études de structure de la  $PrP^{Sc}$  sont entravées par son insolubilité et sa fâcheuse tendance à cristalliser à l'état pur. On suppose cependant qu'il y aurait disparition d'une hélice  $\alpha$  avec mise en place d'une structure plissée composée de deux feuillets  $\beta$  parallèles (Fig.5) . Le pouvoir pathogène de la  $PrP^{Sc}$  résiderait donc dans ce changement conformationnel qui entraîne une forte stabilité aux protéases, notamment les protéases endogènes, ainsi que la propriété de cristalliser et de former *in vivo* des plaques amyloïdes.



**Fig. 5. [67]** Modèle de structure tertiaire de PrP<sup>Sc</sup> humaine.

Le code des couleurs est le suivant : le feuillet S1-β en rouge ; le feuillet S2-β en vert ; les hélices-α H3 et H4 en gris ; la boucle en jaune. Quatre résidus impliqués dans la barrière d'espèce sont indiqués en structure moléculaire (ASN-108, Met-112, Met-129, Ala-133)

### C. Pathogénie

Les études sur la pathogénie des maladies à prions avec les méthodes traditionnelles sont restées assez limitées. En effet, il est difficile de suivre un agent pathogène qui n'a pas auparavant été parfaitement défini. Néanmoins nous exposerons ici les grands principes des mécanismes qui accompagnent la théorie du « protein only ».

#### 1. Contamination

Selon les maladies, on peut avoir plusieurs modes de contamination. Le plus courant est un mode infectieux avec contamination orale, parentérale de façon expérimentale voire accidentelle (cas iatrogène de MCJ ou de tremblante) ou intra-cérébrale.

Pour les maladies héréditaires du type de la fMCJ c'est une mutation du gène de la protéine du prion (*Prn-p*) qui entraîne directement in situ la formation de PrP<sup>Sc</sup>.



## 2. Distribution dans l'organisme

À partir d'inoculations expérimentales, il a été montré que l'infection était rapidement et largement distribuée à partir du point d'injection par le sang. On a alors une « virémie » transitoire de courte durée (environ 48h) [99]. Rien ne laisse supposer qu'une inoculation par voie sanguine aboutisse directement à l'implantation des prions dans le système nerveux central ; par contre, une phase de réplication est rapidement établie dans la rate, les nœuds lymphatiques et d'autres tissus du système lympho-réticulé.

La rate joue un rôle prépondérant. En effet, la splénectomie entraîne un allongement de la période d'incubation. Par contre, dès que la phase neurologique est entamée, la splénectomie ne perturbe pas le déroulement de l'infection [36].

L'invasion du système nerveux est l'étape clé de la pathogénie de ces maladies. Pour les voies parentérales (IV, IP ou SC), le premier site de réplication dans le système nerveux central est la moelle épinière entre les vertèbres thoraciques 4 et 9. Cela suggère fortement que l'infection progresse le long des fibres nerveuses viscérales sympathiques, en direction de la moelle épinière [107].

Dès que l'infection a atteint le système nerveux central, elle progresse facilement à l'intérieur des neurones et plus difficilement de neurone à neurone. On estime que la vitesse de progression dans l'encéphale est de l'ordre de 1 mm par jour.

La durée de la phase de réplication dans le cerveau est variable selon la voie d'entrée de l'agent infectieux : par exemple, la durée après injection intra-cérébrale en zone antérieure est supérieure à la durée après injection intra-veineuse. Ces différences sont dues à l'existence de zones cérébrales cibles. Ainsi, la dissémination de l'infection à l'intérieur de l'encéphale est limitée et le site d'entrée de l'infection détermine le trajet pour atteindre les zones cibles. En entrant par la moelle épinière (inoculation IV), l'infection atteindra les cibles plus rapidement (beaucoup de trajet à l'intérieur des neurones, peu de passages de neurone à neurone) qu'après une inoculation intra-cérébrale (beaucoup de passages de neurone à neurone).

La vitesse d'évolution de la maladie dépend de l'accessibilité de ces cibles ; le temps d'incubation est d'autant plus court que ces cibles sont facilement atteintes.

L'efficacité de ce ciblage dépendrait de deux facteurs : le génotype de l'hôte et la lignée de l'agent. De plus, ce ciblage déterminerait aussi la forme clinique de la maladie en fonction des zones atteintes. On a longtemps pensé que les cellules impliquées dans la multiplication des prions étaient les neurones, mais en fait, il s'agirait plus probablement des astrocytes. En effet même si des PrP<sup>Sc</sup> sont facilement détectées dans les neurones, les plus grandes concentrations se retrouvent dans les astrocytes [46].

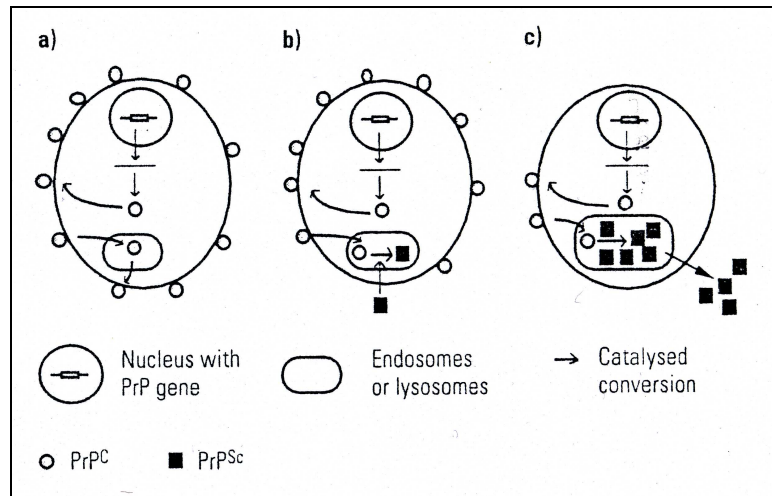
À partir du moment où les particules infectieuses ont atteint les cibles, elles s'y multiplient jusqu'à arriver à une concentration de plateau. Dès lors, les modifications histologiques apparaissent. La nature de la lésion primaire n'est pas connue, mais il est plausible que les modifications de la PrP<sup>C</sup>, ainsi que peut-être d'autres protéines, et surtout l'accumulation de PrP<sup>Sc</sup>, causent un dysfonctionnement progressif allant jusqu'à la mort par apoptose dans certaines populations de neurones. Le mécanisme pathogénique précis n'est pas encore élucidé.

### 3. Synthèse de la PrP<sup>Sc</sup>

#### a. Production de la PrP<sup>C</sup>

Aucune différence de structure primaire n'a été mise en évidence entre la PrP<sup>C</sup> et la PrP<sup>Sc</sup>. La première étape de la synthèse de la PrP<sup>Sc</sup> consiste donc en la synthèse de la PrP<sup>C</sup>.

La PrP<sup>C</sup> est codée par le gène *Prn-p*. On a pu montrer par exemple chez le hamster de Syrie que ce gène code pour une protéine de 254 acides aminés. La partie codante est dans un seul exon porté par le chromosome 20 chez l'homme et par le chromosome 2 chez la souris. La synthèse de la PrP<sup>C</sup> suit les mécanismes classiques de synthèse des protéines dans le réticulum endoplasmique, puis la protéine est portée en surface de la membrane cellulaire par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi [49]. La PrP<sup>C</sup> est alors fixée à la membrane par un lien Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI). Dans le cas non pathologique, elle est ensuite recyclée par la voie lysosomiale (fig. 6).

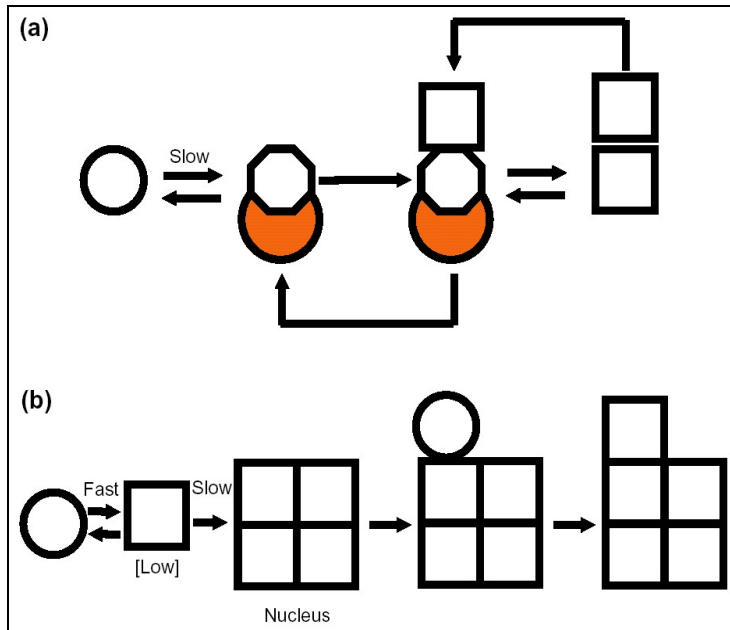


**Fig. 6. [146]** Hypothèse de propagation du prion

- Dans la cellule normale, la PrP<sup>C</sup> est synthétisée, transportée jusqu'à la surface cellulaire et recyclée.
- L'hypothèse du « protein only » suppose que le prion est identique à la PrP<sup>Sc</sup>. Les prions exogènes causent la conversion de la protéine cellulaire normale PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>, soit à la surface cellulaire ou après internalisation.
- La PrP<sup>C</sup> s'accumule intracellulairement dans les endosomes ou les lysosomes ; la surface cellulaire se retrouve dénuée de PrP<sup>C</sup> alors que la PrP<sup>Sc</sup> est relâchée dans l'espace intercellulaire

*b. Transformation de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>*

On retrouve deux hypothèses concernant la formation de PrP<sup>Sc</sup>. Dans un premier modèle, la PrP<sup>C</sup> serait naturellement en équilibre avec une forme complexée dite PrP\* [38]. Elle serait alors liée à un facteur auxiliaire, encore non précisément identifié, appelé protéine X [139]. La PrP<sup>Sc</sup> pourrait alors interagir avec le complexe PrP\*-protéine X et entraîner ainsi le changement de conformation de PrP\* en PrP<sup>Sc</sup>. La nouvelle PrP<sup>Sc</sup> ainsi formée pourra à son tour entraîner la transformation d'une autre PrP\* en PrP<sup>Sc</sup> et ainsi de suite (fig.7a).



**Fig. 7a et 7b [140]**

### La réplication du prion.

Il existe au moins deux conformations de la PrP. PrP<sup>C</sup> représentée par des cercles et PrP<sup>Sc</sup> représentée par des carrés.

a) Dans le modèle de complexation, PrP<sup>C</sup> existe en équilibre avec PrP\*, représentée par un octogone, qui est attachée au facteur auxiliaire appelé protéine X (représenté en orange). Le complexe PrP\*-protéine X interagit avec la PrP<sup>Sc</sup> entraînant un changement de conformation de la PrP\*. Le résultat final est deux molécules de PrP<sup>Sc</sup> qui sont libres pour induire de nouveaux changements de conformation de PrP\*.

b) Dans le modèle nucléation-polymérisation, la conversion entre PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> est normalement réversible et la barrière à la conversion réside au niveau du procédé initial de formation du noyau. Une fois que les agrégats de PrP<sup>Sc</sup> sont formés, ils produisent la conversion de PrP<sup>C</sup> en s'y ligant et en stabilisant la conformation autrement défavorisée de PrP<sup>Sc</sup>.

Le second modèle découle d'étude de conversion *in vitro* de PrP<sup>C</sup> marqué par des radioéléments. On aurait alors formation d'un noyau de polymérisation de PrP<sup>Sc</sup> pouvant promouvoir le changement de conformation de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> (fig.7b).

Quel que soit le modèle on aurait donc un changement de conformation de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> qui se catalyse par la PrP<sup>Sc</sup> elle-même.

L'hypothèse du « protein only » offre donc un modèle cohérent pouvant expliquer les propriétés physico-chimiques et la pathogénie constatées lors des maladies à prions. En revanche les méthodes classiques de prospection ne permettent pas d'en explorer la réalité.

## Deuxième partie : Données sur la transgénèse

Les moyens d'investigations classiques ne suffisant pas à l'étude des maladies à prions, les chercheurs ont développé de nouveaux outils que sont les souris transgéniques. Nous nous attacherons dans cette partie à décrire les grands principes de la transgénèse ainsi que ses possibilités d'application.

Les premiers travaux publiés sur la transgénèse remontent à plus de vingt ans [57, 68]. Dès 1981 l'adjectif transgénique fut attribué à des animaux dans le génome desquels a été introduit expérimentalement un fragment d'ADN qui peut être transmis à leur descendance. Très vite, cet outil est apparu extrêmement puissant pour aborder, de façon non réductrice, des études sur la fonction et la régulation de l'expression de gènes, mais également pour l'obtention d'animaux présentant des phénotypes impossibles à obtenir par simple sélection. La première et très médiatisée démonstration des énormes potentialités que cette technique offre, fut l'obtention de souris « géantes » exprimant le gène de l'hormone de croissance de rat [96].

À cette époque, les chercheurs disposaient de deux techniques pour introduire l'ADN étranger dans le génome de l'hôte : la micro-injection et l'infection rétrovirale. Depuis, d'autres méthodes sont progressivement apparues, dont l'utilisation de cellules embryonnaires totipotentes (dites cellules ES) [59, 120], permettant une manipulation de plus en plus fine du génome.

### I. Les différentes méthodes de transfert de gènes chez la souris

#### A. La micro-injection

Cette méthode consiste à injecter dans un des pronucléi d'un œuf fécondé quelques picolitres d'une solution tamponnée renfermant plusieurs centaines de copies du fragment d'ADN

que l'on désire intégrer dans le génome de l'hôte. Afin de faciliter l'intégration de cet ADN, celui-ci doit se présenter sous forme linéaire. Après avoir été micro-injectés, les œufs sont implantés dans le tractus génital de souris pseudo-gestantes. Seulement 10 à 20 % des œufs se développent et donnent naissance à des souriceaux. Le caractère transgénique de ces animaux sera révélé par la détection du transgène dans leur ADN. Au final seul 15 à 25 % des animaux analysés seront porteurs du transgène, ce pourcentage pouvant varier considérablement d'une expérience à l'autre.

Cette méthode ne permet le contrôle ni du site d'intégration qui semble se faire de manière aléatoire, ni du nombre de copies du transgène intégrées. On observe en général un seul site d'intégration par animal, pouvant entraîner à sa proximité des réarrangements de l'ADN [119], voire la mutagenèse d'un gène endogène dans 5 % des cas [86]. Le mécanisme sous-jacent à l'intégration d'un transgène reste peu connu, mais semble faire appel à des phénomènes de réparation par ligation de cassures existantes dans l'ADN de l'hôte [12]. Lorsque plusieurs copies sont intégrées dans un même site elles sont souvent orientées en tandem. Cette disposition refléterait la formation, avant leur intégration, de « chaînes » de copies du transgène par recombinaison homologue. Malgré l'injection du transgène au stade pronucléus, on obtient le plus souvent des animaux transgéniques mosaïques c'est-à-dire que seules certaines cellules comportent le transgène recherché. Cela suggère que l'intégration du transgène ne se fait qu'après la première division cellulaire [152].

## B. L'infection rétrovirale

La possibilité d'incorporer des virus dans le génome de la souris à un stade précoce du développement embryonnaire afin qu'ils colonisent la lignée germinale a été démontrée dès 1976 par Jaenisch [68]. L'utilisation de tels vecteurs pose le problème de leur innocuité et seuls des vecteurs rétroviraux ou des adénovirus défectifs sont actuellement employés. En pratique on remplace les gènes qui permettraient au virus d'assurer sa réplication par le transgène d'intérêt. Ces éléments manquants sont fournis in trans lors de la construction et la multiplication des vecteurs par l'intermédiaire de cellules dites « helper » qui synthétisent ces protéines. Néanmoins la taille des gènes pouvant être incorporés reste limitée par les contraintes de l'encapsulation de l'ADN.

L'incorporation de l'ADN d'un rétrovirus dans le génome de l'hôte ne peut s'effectuer qu'au cours d'une division cellulaire, au niveau d'un site qui semble aléatoire même s'il est souvent localisé à proximité de régions sensibles à la DNase [119]. Cela se traduit par l'obtention d'animaux transgéniques à des taux équivalents à ceux obtenus par la micro-injection, mais qui sont très mosaïques. Chez ces animaux, plusieurs sites d'intégration peuvent être détectés au sein d'une même cellule, entre cellules d'un même tissu ou de deux tissus différents, chaque site renfermant une simple copie de l'ADN rétroviral. L'infection rétrovirale a été relativement peu utilisée en transgénèse chez les mammifères car elle présente moins d'intérêt que la micro-injection. En revanche, à l'inverse des rétrovirus, les adénovirus peuvent s'intégrer dans des cellules qui ne se divisent pas. Ils ont été utilisés avec succès pour infecter des œufs au stade pronucléi ; les souris transgéniques obtenues présentaient un site unique d'intégration et peu ou pas de mosaïcisme [144].

### C. L'utilisation de cellules embryonnaires totipotentes (cellules ES)

Les cellules embryonnaires totipotentes, ou cellules ES (pour « Embryonic Stem »), sont des cellules issues du bouton embryonnaire d'un blastocyste ou d'un embryon au stade morula, qui peuvent être maintenues en culture sans pour autant se différencier [50, 84]. Ces cellules, une fois réintroduites dans des embryons, participent à l'élaboration d'un animal chimérique c'est-à-dire qui comporte des cellules provenant d'animaux différents. Leur totipotence leur permet en théorie de coloniser tous les tissus du nouvel animal, y compris la lignée germinale. Au cours de leur phase de culture *in vitro*, ces cellules peuvent être manipulées par des techniques classiques de transfection afin d'introduire l'ADN d'intérêt. Il est possible alors de sélectionner les clones transformés, sans altération de la totipotence des cellules. Ainsi, il est envisageable de rechercher des phénomènes rares d'intégration, telle une intégration ciblée par recombinaison homologue grâce au système Cre/lox (fig.8).

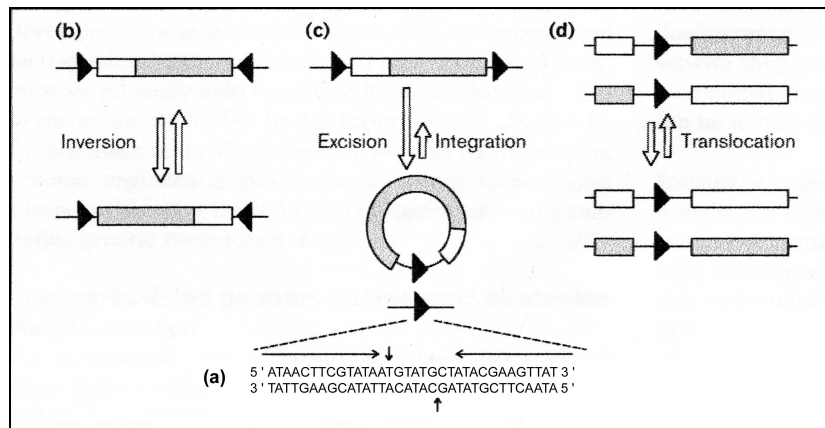


Fig. 8. [87]

### Le système de recombinaison Cre-lox site-spécifique

La Cre est une recombinase qui produit une recombinaison site spécifique entre deux séquences de reconnaissance 34 bploxP (triangles)

- La séquence lox P est constituée de deux répétitions de 13 pb inversées (flèche horizontale) flanquant une région centrale asymétrique qui confère une orientation. Les deux sites clivés par Cre sont indiqués par les flèches verticales.
- La recombinaison entre 2 sites loxP insérés dans la même molécule d'ADN (recombinaison intramoléculaire) d'orientation opposée conduit à une inversion du segment
- La recombinaison entre 2 sites loxP insérés dans la même molécule d'ADN dans le même sens produit une excision de la région centrale avec formation d'un ADN circulaire.

Lorsque les sites loxP sont localisés sur des molécules d'ADN séparées (recombinaison intermoléculaire), on peut avoir une intégration d'ADN (c) ou une translocation (d).

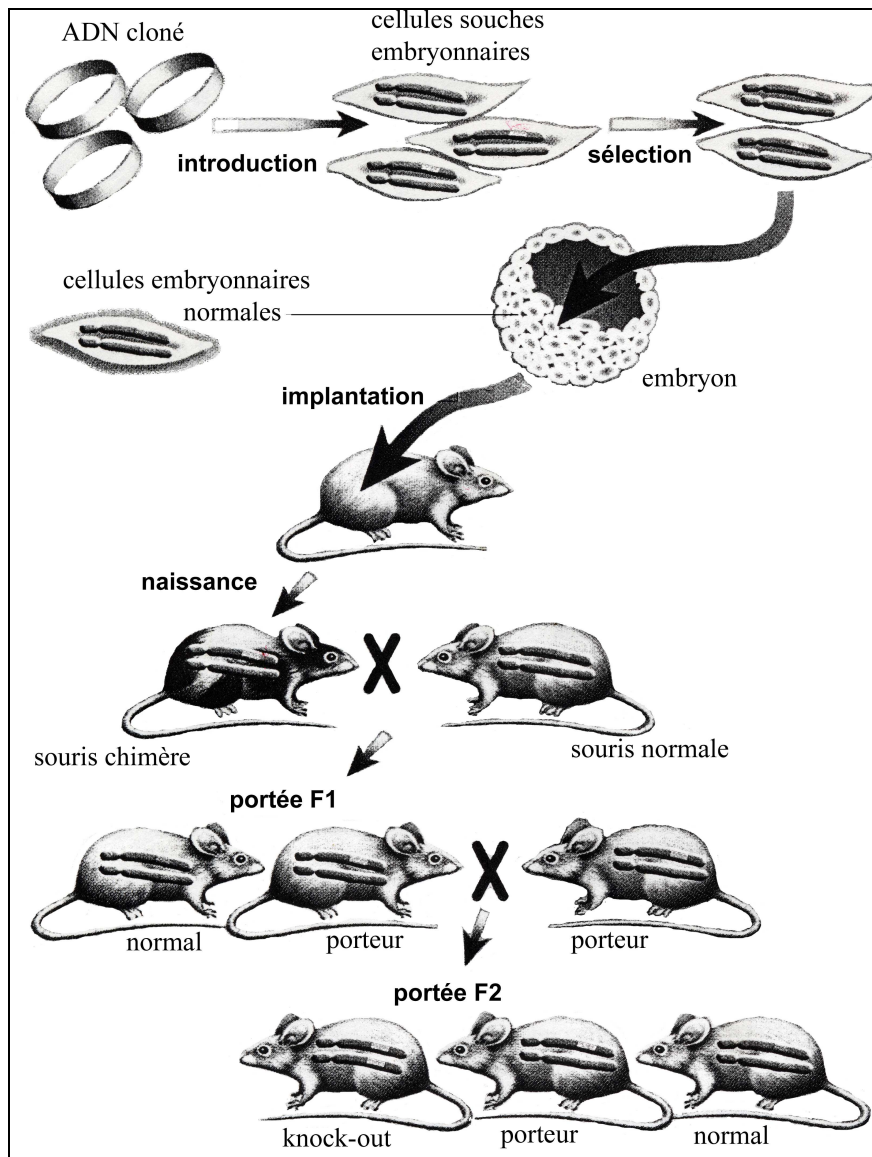
L'utilisation de ces cellules permet donc une manipulation fine du génome, pouvant aller de l'invalidation d'un gène à la simple substitution d'une base par une autre. Les cellules ES ont également été utilisées pour incorporer dans des souris des chromosomes humains entiers par des fusions avec des micro-cellules. La transmission germinale du chromosome 2 humain par des souris transgéniques a ainsi été obtenue [143].

Cependant, cette méthodologie reste délicate d'emploi. En effet, les cellules ES restent peu définies et, malgré leur relative stabilité, ont tendance à se différencier. Le chimérisme des animaux obtenus se traduit par un très faible taux de transmission du transgène à la génération suivante. Par introduction de ces cellules dans des blastocystes tétraploïdes, des embryons uniquement constitués par des cellules ES ont cependant pu être produits [147].

Au final après transgénèse, on obtient le plus souvent en première génération des animaux mosaïques ou chimères. Ces animaux sont ensuite croisés avec une lignée sauvage de souris. À la première génération (F1), on obtient des hétérozygotes dont certains possèdent le gène



recherché. En croisant les souris F1 entre elles, on peut alors obtenir en F2 des homozygotes pour le gène recherché (fig.9).



**Fig. 9** Produire des souris « knock-out » [89]

On introduit un fragment d'ADN circulaire portant le gène altéré recherché dans des cellules souches embryonnaires totipotentes (cellules ES). Les cellules ES porteuses du gène altéré sont sélectionnées puis réintroduites dans un embryon que l'on va alors implanter dans une mère porteuse. Cette mère donne naissance à des souris chimères qui portent le gène altéré. On procède ensuite à un croisement en retour avec une souris normale. La portée F1 est constituée de souris normales et de souris porteuses du transgène. Les souris porteuses de la F1 sont croisées entre elles pour donner une F2 constituée de souris knock-out, de souris porteuses et de souris normales.

## II. Potentialité de la transgénèse

La transgénèse s'est imposée comme un outil essentiel pour l'étude de la régulation et de la fonction des gènes. Elle permet en effet d'effectuer des analyses dans la complexité d'un organisme complet, à différents stades de développement, et est de fait beaucoup plus informative que les expériences de culture cellulaire. Outre des recherches fondamentales comme la possibilité d'isoler des gènes exprimés au cours du développement ou impliqués dans le contrôle d'une fonction biologique particulière par « piégeage de gènes », la transgénèse offre également des possibilités de recherches plus appliquées, par exemple l'étude des maladies à prions. On pourra aussi avoir des applications d'ordre zootechnique.

### A. Le franchissement de la barrière d'espèce et de la barrière tissulaire

La transgénèse permet l'expression d'un gène d'une espèce dans une autre. On pourra ainsi produire des animaux synthétisant des protéines analogues et normalement produites par une autre espèce. Elle offre également la possibilité de modifier le profil d'expression d'un gène par l'utilisation de séquences régulatrices provenant d'un autre gène, pouvant ainsi permettre l'expression de certains gènes dans des tissus où ils ne sont naturellement pas transcrits.

### B. Variations quantitatives de l'expression d'un gène

#### 1. Augmentation de l'expression

L'augmentation du niveau d'expression d'un gène peut être obtenue en transgénèse par micro-injection par augmentation du nombre de copies du gène. Une variation quantitative transitoire peut être obtenue grâce à l'utilisation de promoteurs inductibles, par exemple les promoteurs dont l'activité est induite en présence de tétracycline [58].

#### 2. Diminution de l'expression

L'invalidation d'un gène peut être obtenue par recombinaison homologe dans des cellules ES. Il est également possible de limiter cette invalidation à un tissu donné. On peut par exemple introduire par recombinaison homologe de part et d'autre du gène deux courtes séquences de type *loxP*. Il suffit ensuite de cibler l'expression d'une recombinase, l'enzyme

Cre, dans le tissu cible par transgénèse classique. Cette enzyme va alors exciser la région du génome comprise entre les deux sites *loxP*, provoquant l'invalidation du gène [130].

Alternativement, une diminution du niveau d'expression d'un gène est possible par ciblage d'ARNs antisens ou de ribozymes contre ses messagers [147]. Malheureusement l'amplitude de la réponse obtenue est aléatoire et non contrôlée. Il est également possible, à partir de souris porteuses d'un gène invalidé, de maîtriser son niveau d'expression en micro-injectant dans ces animaux ce gène sous dépendance d'un promoteur inductible.

L'avancement des connaissances sur la régulation de l'expression des gènes devrait permettre d'identifier des éléments cis-régulateurs impliqués dans l'amplitude de la transcription. De tels éléments pourraient alors être soit ajoutés à des gènes dont on souhaiterait augmenter l'expression, soit au contraire éliminés. Il en va de même pour des éléments qui stabilisent les ARNm et/ou augmentent l'efficacité de leur traduction.

### C. Remaniements chromosomiques

La transgénèse, en s'appuyant sur les techniques de recombinaison par l'intermédiaire de séquences cibles, par exemple le système Cre/*loxP*, permet également d'induire de profondes altérations dans la structure du génome.

#### 1. Inversion de gènes

L'ordre des gènes au sein d'un locus peut être inversé en plaçant, par recombinaison homologue, deux séquences *loxP*, en orientation inverse, de part et d'autre de la région concernée. L'expression transitoire de l'enzyme Cre conduit alors à l'inversion du fragment d'ADN compris entre ces deux sites [134].

#### 2. Délétions/Duplications intra-chromosomiques

La délétion et la duplication d'une région d'un chromosome ont été réalisées après insertion, par recombinaison homologue, à une extrémité de la zone d'intérêt d'un site *loxP* sur un des deux chromosomes homologues, et d'un second site *loxP*, dans la même

orientation, à l'autre extrémité de cette zone, sur le second chromosome. L'expression de l'enzyme Cre au cours de la prophase de la méiose conduit à une recombinaison entre chromosomes appariés par l'intermédiaire des sites *loxP*. Il en résulte une duplication de la région ciblée sur un des chromosomes et sa délétion dans l'autre [62].

### 3. Perte d'un chromosome

La présence de deux sites *loxP*, en orientation inverse, sur les deux chromosomes homologues, provoque en présence de l'enzyme Cre des recombinaisons entre chromatides sœurs. Si ces recombinaisons sont inégales, l'un des chromosomes ne présentera plus de centromère et sera donc perdu au cours de la division cellulaire tandis que l'autre, qui possédera deux centromères, sera soit également perdu au cours de la mitose, soit uniquement transmis à une des deux cellules filles [80].

La transgénèse offre un éventail de techniques variées permettant d'explorer de façon très précise le génome et les fonctions cellulaires. Elle a permis d'approfondir les connaissances sur les maladies à prions.

## Troisième partie : Utilisation de l'outil transgénique dans l'étude des ESST

Les méthodes d'études classiques ont laissé de grandes zones d'ombre concernant l'hypothèse du prion. Nous allons examiner dans cette partie l'apport des souris transgéniques aux connaissances sur le prion.

### I. Apports sur la nature et la structure du prion

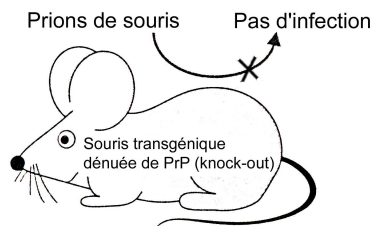
#### A. Preuves transgéniques du « protéin only »

Lorsque Stanley B. Prusiner pose la définition du prion il s'appuie sur le fait que l'on n'a jamais trouvé autre chose que de la matière protéique au sein d'un concentré de matière infectieuse. Or l'absence de preuve n'étant pas preuve de l'absence, de nombreux chercheurs continuaient à explorer des hypothèses telles que le virino. Pour cela, ils prenaient argument de l'existence de souches de prions, et donc d'une apparente information génétique contenue au sein de l'ATNC. Les souris transgéniques ont finalement donné raison à Prusiner.

#### 1. Utilisation de souris « Knock-out »

Le mode de réplication du prion envisagé dans l'hypothèse du « protein only » prédit qu'un animal dénué de PrP<sup>C</sup> est résistant à une infection par les prions.

L'outil transgénique permet de fabriquer des souris « knock-out », c'est-à-dire des souris dont un gène a été supprimé par recombinaison homologe grâce au système Cre/lox. En pratique, un des allèle du gène *Prnp* des cellules ES est remplacé par un ADN étranger. Ces cellules ES sont réintroduites dans des blastocystes qui vont donner des souris chimères. Par croisements appropriés, des homozygotes sans le gène *Prnp* (*Prnp*<sup>0/0</sup>) sont alors obtenus (cf. Fig 8). Plusieurs groupes de chercheurs ont obtenu des souches souris *Prnp*<sup>0/0</sup> différents (a,b,c). Ces différentes souches ont toutes des phénotypes différents (expliqués à la fois par leurs origines de souches différentes et par les diverses méthodes utilisées pour neutraliser le gène de la PrP). Ces souris « Knock-out » ont été inoculées par des prions de souris atteintes de tremblante (cf. Fig 10).

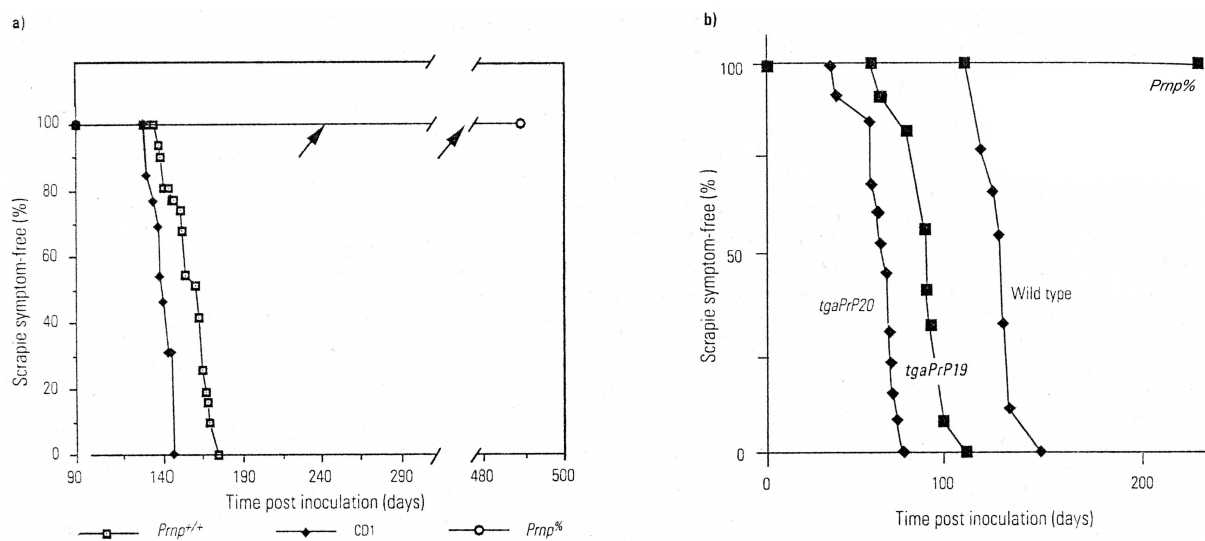


**Fig. 10. [79]**

Les souris transgéniques dénuées de PrP ( $Prnp^{-/-}$  ou souris knock-out) sont résistantes à l'infection et à la propagation des prions de souris. Ces souris présentent comme seul phénotype une altération de certaines fonctions synaptiques. Il est possible de restaurer ces fonctions par réintroduction du gène  $Prnp$ .

Quelle que soit la souche, on constate alors que la  $PrP^C$  est indétectable dans le cerveau des souris  $Prnp^{0/0}$  alors qu'on la retrouve à la moitié de son taux normal dans le cerveau des hétérozygotes  $Prnp^{0/+}$  [25]. Ces souris « knock-out » semblent normales si ce n'est quelques troubles du sommeil [142]. Certains chercheurs ont suggéré que ces souris avaient des déficiences synaptiques [43, 153] mais cela n'a pas été confirmé [81]. Ces souris, une fois inoculées par du prion, y sont complètement insensibles (fig.11a). Le cerveau des souris  $Prnp^{0/0}$  ne présente pas de prion à un niveau détectable. En revanche, les souris  $Prnp^{+/+}$  inoculées par le prion en présentent dès la huitième semaine, avec un taux augmentant jusqu'à la vingtième semaine (tableau X) [24, 121].

La présence de la PrP pour que la maladie puisse se développer est donc essentielle, ce qui est en accord avec l'hypothèse du prion. Par ailleurs ces souris « knock-out » vont être la base de nombreuses autres expériences.



**Fig. 11. [146]** Résistance des souris Knock-out à la  $PrP^{Sc}$

- Les souris  $Prnp^{0/0}$  demeurent sans symptôme après inoculation avec du prion de souris atteintes de tremblante alors que les souris  $Prnp^{+/+}$  de la même portée ou les souris sauvages de type CD-1 présentent des symptômes de tremblante.
- Les souris  $Prnp^{0/0}$  sont rendues transgéniques pour le gène  $Prnp$ . Les souris  $tga19/+$  ont 3 à 4 fois le taux normal de  $PrP^C$  ; les souris  $tga20/+$  ont 6 à 7 fois le taux normal.

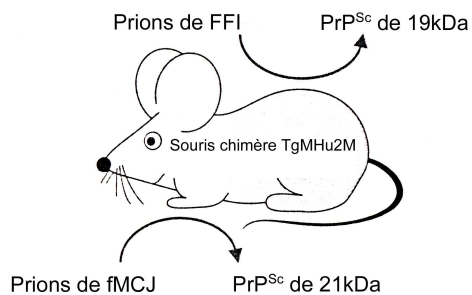
## 2. Diminution des temps d'incubation

À partir de souris *Prnp*<sup>0/0</sup>, différents gènes codant pour la PrP ont pu être insérés.

Ont été ainsi obtenues des lignées de souris produisant trois à quatre fois le taux normal de PrP (lignée tga19/+) et d'autres six à sept fois (lignée tg20/+) [51]. En comparant les temps d'incubation (Fig.11b), on constate que plus la PrP est exprimée plus l'animal est sensible au prion. La sensibilité est donc corrélée au niveau d'expression de la PrP et non au pouvoir infectieux d'un éventuel virino.

## 3. Utilisation de transgène chimère souris-humain

Une lignée de souris transgène chimère souris-humain, dite TgMHu2M exprimant une PrP hybride entre la PrP murine et la PrP humaine a été fabriquée. Ces souris sont alors inoculées avec des prions provenant soit de malade de FFI, soit de malade de fMCJ [137] (Fig.12). On constate alors que ces mêmes souris vont produire selon l'inoculat utilisé deux types de PrP<sup>Sc</sup> différents par leur poids moléculaire après protéolyse modérée (tableau VI). Ces deux PrP<sup>Sc</sup> ont des poids moléculaires identiques aux PrP<sup>Sc</sup> isolées chez les malades de FFI et de fMCJ respectivement. Il est difficile d'imaginer qu'un virus puisse produire différentes molécules de PrP<sup>Sc</sup> mutantes correspondant à la FFI ou à la fMCJ et ensuite induire la production de différentes PrP<sup>Sc</sup> après transmission à des souris transgènes.



**Fig. 12 [79]**

Les souris transgéniques chimères TgMHu2M produisent selon la souche de prions utilisée lors de l'inoculation, des PrP<sup>Sc</sup> conduisant après protéolyse modérée à la synthèse de molécule ayant un poids moléculaire identique à celui obtenu respectivement par protéolyse modéré des deux types d'inoculat.

Inoculat	Hôte	Génotype	Temps d'incubation en jours	(n/n <sub>0</sub> )	PrP <sup>Sc</sup> , kDa
Aucun	Humain	FFI(D178N,M129)			19
FFI	Souris	Tg(MHu2M)	206 ± 7	(7/7)	19
FFI→Tg(MHu2M)	Souris	Tg(MHu2M)	136 ± 1	(6/6)	19
Aucun	Humain	fMCJ(E200K)			21
fMCJ	Souris	Tg(MHu2M)	170 ± 2	(10/10)	21
fMCJ→Tg(MHu2M)	Souris	Tg(MHu2M)	167 ± 3	(15/15)	21

Tableau VI : Souches de prion distinctes générées chez l'humain par des maladies à prions d'origine génétique et leur transmission à des souris transgéniques

Souris Tg(MHu2M) : souris transgène chimère souris-humain exprimant une PrP hybride entre la PrP murine et la PrP humaine.

FFI→Tg(MHu2M) : inoculat provenant de souris (MHu2M) malades inoculées par des extraits cérébraux de malades de FFI.

#### 4. Prions artificiels

Des souris transgéniques exprimant un gène *Prnp* altéré ont été produites [92, 93]. En supprimant sur le gène la partie N-terminale, on a ainsi obtenu des souris produisant des molécules PrP de seulement 106 acides aminés (au lieu de 254) appelées PrP106. Après inoculation de ces souris par des prions RML (souche produite par le Rocky Mountain Laboratory) on obtient une encéphalopathie avec production de PrP<sup>Sc</sup> 106. En utilisant ces PrP<sup>Sc</sup> 106 comme inoculat, on obtient une encéphalopathie dans des délais fortement raccourcis (tableau VII)(218), avec des symptômes inhabituels ainsi qu'une répartition originale des lésions du système nerveux.

Il paraît difficile d'imaginer qu'un virus puisse transmettre la maladie aux souris Tg(PrP106)*Prnp*<sup>0/0</sup> et qu'il ne puisse plus par la suite la transmettre aux souris Tg(MoPrP-A). Les miniprions néoformés en revanche peuvent être incapables de transformer les PrP des souris Tg(MoPrP) puisqu'ils ont une structure primaire et donc aussi tertiaire différente.



Hôte	Temps d'incubation, jours (n/n <sub>0</sub> )	
Tg(PrP106) <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>	Mini-prions RML 106 66 ± 3 (10/10)	Prions RML 300 ± 2 (9/10)
Tg(MoPrP-A)	> 250 (0/11)	50 ± 2 (16/16)

Tableau VII : Susceptibilité et résistance de souris transgènes aux mini-prions artificiels.

Ainsi de nombreuses expériences utilisant des souris transgéniques permettent de confirmer la définition du prion, en particulier l'absence d'acide nucléique.

### B. Apports sur la structure du prion

L'essentiel des connaissances acquises sur la structure du prion l'ont été grâce à des protéines recombinantes produites dans *Escherichia coli*. Néanmoins l'étude des souris transgéniques a permis d'éclairer certains points.

- La production de PrP chimères Sha/Mo (hamster de Syrie/souris) et Hu/Mo (humain/souris) avec une augmentation de la sensibilité respectivement aux prions de hamster ou d'homme, ont permis d'identifier une région de la PrP (résidus 95-170) où la PrP<sup>C</sup> peut se lier à la PrP<sup>Sc</sup> [126, 138]. De pareilles études avec un transgène chimère Bo/Mo (bovin/souris) ont été conduites pour étudier l'ESB [128]. On a alors paradoxalement constaté que le transgène chimère était moins sensible à l'ESB (cf. infra) que des souris de type sauvage. Les différences entre les séquences du transgène et des deux gènes « parentaux » ont été examinées [128]. On a ainsi pu identifier un second domaine constitué des résidus 180-205 qui semble moduler l'interaction entre la PrP<sup>C</sup> et la PrP<sup>Sc</sup>.
- On a constaté que les souris « knock-out » *Prnp*<sup>0/0</sup> avaient un plus faible taux de superoxyde dismutase (SOD) que les témoins [18]. Or l'activité de la SOD reflète l'état du métabolisme du cuivre [60]. On a alors fait des mesures dans des extraits membranaires provenant de cerveau de souris *Prnp*<sup>0/0</sup>, qui ont montré un faible taux de cuivre alors que les taux de fer et de zinc restent inchangés. On a ainsi pu montrer que la PrP<sup>C</sup> pourrait avoir une fonction de portage du cuivre par chélation [17].

- Enfin l'étude des mini-prions et plus particulièrement du PrP 106 [92, 93] apportera des éclaircissements sur la structure. On peut penser en effet qu'il sera plus facile de déterminer la structure de la PrP<sup>Sc</sup>106 (qui garde un plein pouvoir infectieux) que la structure de la PrP<sup>Sc</sup> pleine taille.

### C. Souches de prions

L'existence de souches de prions pose la question : comment une molécule dénuée d'acide nucléique peut coder pour une information biologique transmissible ? [45, 72, 73, 118]

Les souches de prions sont définies par leur temps d'incubation après trois passages successifs sur une lignée de souris, ainsi que par la localisation des lésions cérébrales [45, 52]. Les gènes des PrP des lignées de souris C57B et I/Ln (qui ont des temps d'incubation longs et courts pour la tremblante) codent pour des PrP dont la séquence ne diffère qu'en deux points [27, 28, 150, 91]. On découvrit ensuite une lignée de prion dite DY, provenant du vison, que l'on transmet à des hamsters de Syrie [9, 10, 11]. Les PrP<sup>Sc</sup> des prions DY ont montré des particularités spécifiques : en effet ils ont une faible résistance à la protéinase K ainsi qu'un site de clivage particulier. La lignée DY présente donc une mystérieuse anomalie, surtout depuis que l'on a trouvé d'autres lignées de prions ayant des temps d'incubation similaires mais ne montrant pas une augmentation de la sensibilité à la protéinase K [127].

On put aussi remarquer l'apparition de nouvelles lignées de prions après passage sur des animaux ayant différents *Prnp* [127, 71].

Une fois de plus, la preuve formelle que l'information spécifique de la souche était encodée dans la structure tertiaire de la protéine est venue des souris transgéniques. En effet grâce à l'expérience déjà évoquée (tableau VI), on a pu montrer qu'un même transgène MHu2M pouvait produire, selon que l'on inoculait par des extraits cérébraux provenant de malades de FFI ou de fMCJ, des PrP<sup>Sc</sup> différant par leur poids moléculaire après protéolyse modérée (respectivement 19 et 21 kDa) [137]. Après un second passage, les souris Tg(MHu2M) inoculées par des prions FFI montrent un délai d'incubation d'environ 130 jours et une PrP<sup>Sc</sup> de 19kDa alors qu'on retrouve chez celles inoculées par les prions fMCJ un temps d'incubation d'environ 170 jours et une PrP<sup>Sc</sup> de 21 kDa [111]. Ces données

expérimentales indiquent que la MHu2MPrP<sup>Sc</sup> peut exister sous deux conformations différentes (par la taille des fragments résistant à la protéase) alors que la séquence des acides aminés reste invariante. C'est donc la structure tertiaire qui détermine la souche de prions alors que la structure primaire détermine l'espèce « cible ».

## II. Apports sur la pathogénie

Indépendamment des recherches menées sur la nature du prion, on a pu montrer que le gène de la PrP était lié au locus contrôlant le temps d'incubation de la tremblante [28]. Par la suite, on découvrit que des mutations sur le gène de la PrP étaient responsables des maladies à prions d'origine familiale. Dans un même temps l'expression d'un transgène de la PrP de hamster de Syrie (Sha) dans une souris, la rendant ainsi hautement sensible au prion de hamster de Syrie, a montré que l'expression d'un gène de PrP étranger pouvait abroger la barrière d'espèce [125]. Plus tard, on put constater que les souris « knock-out » dénuées de gène de la PrP (*Prnp*<sup>0/0</sup>) étaient résistantes à l'infection par les prions et ne pouvaient pas, comme cela était attendu, répliquer le prion [24, 104].

Les résultats de ces études nous indiquent que la PrP doit jouer un rôle central dans la transmission et la pathogénèse des maladies à prions ; ils suggèrent également que la forme anormale de la PrP est un composant essentiel de la particule prion [110].

### A. Contrôle de la longueur du temps d'incubation.

Le temps d'incubation de la tremblante chez la souris est un critère utilisé pour distinguer des souches de prion. Le gène contrôlant sa longueur [45, 127] fut initialement appelé *Sinc*. Sa mise en évidence repose sur des croisements entre deux lignées pures de souris (C57BL et VM) qui avaient des temps d'incubation différents (court pour la première et long pour la seconde [45]). À cause de la rareté de la lignée VM, on rechercha une autre lignée de souris ayant un temps d'incubation long : la lignée I/Ln, qui semble avoir un ancêtre commun avec la lignée VM [27, 74]. Grâce à des expériences avec des ADN circulaires de PrP, on put démontrer un lien entre le gène de la PrP et le locus contrôlant le temps d'incubation, avec des

croisements entre les lignées de souris NZW/LacL et I/Ln [28]. Finalement, on découvrit que le gène contrôlant le temps d'incubation (*Prn-i*) et le gène de la PrP (*Prnp*) étaient intimement liés voire identiques [150]. Bien que les substitutions d'acides aminés entre les PrP de NZW (*Prnp<sup>a</sup>*) et de I/Ln (*Prnp<sup>b</sup>*) aient montré la similitude entre *Prnp* et *Prn-i*, les expériences de souris *Prnp<sup>a</sup>* exprimant des transgènes *Prnp<sup>b</sup>* ont révélé un « paradoxal » raccourcissement du temps d'incubation [151]. Or la théorie prédisait un allongement du temps d'incubation, puisque par croisement Mendélien le gène *Prnp<sup>b</sup>* paraissait dominant [28, 45]. Cette différence s'explique par le fait que le nombre de copies du gène de la PrP est augmenté chez les animaux transgéniques [26]. Lorsqu'on inocule une souris transgénique Tg(*Prnp<sup>b</sup>*)*Prnp<sup>a</sup>* l'augmentation du nombre de copies du gène de la PrP est prédominant et provoque une réduction du temps d'incubation. L'ensemble de ces expériences indique que le gène *sinc* comme le gène *Prn-i* fait partie intégrante du gène de la PrP [26]. Des expériences plus récentes de ciblage de gène par hybridation l'ont depuis démontré [91].

## B. Barrière d'espèce

Le passage de prions d'une espèce à une autre est souvent un procédé stochastique, presque toujours caractérisé par des temps d'incubation prolongés au cours du premier passage dans le nouvel hôte [100]. Cela caractérise la barrière d'espèce. Les prions synthétisés *de novo* reflètent la séquence de la PrP<sup>C</sup> de l'hôte [13]. Après des passages successifs sur un même hôte, le délai d'incubation se raccourcit jusqu'à un temps d'incubation minimum caractéristique.

Le donneur de prion est le dernier mammifère où est passé le prion, et la séquence de sa PrP détermine « l'espèce » du prion. La souche de prion, qui semble inscrite dans la conformation de la PrP<sup>Sc</sup>, interagit avec la séquence de la PrP du receveur pour déterminer la structure tertiaire de la nouvelle PrP<sup>Sc</sup>. Ces principes ont été démontrés par l'étude de la transmission de prion de SHa à des souris exprimant un PrP transgène de hamster de Syrie (ShaPrP), abrogeant ainsi la barrière d'espèce [125]. Comme la séquence de la PrP, la lignée du prion modifie la transmission du prion de SHa à la souris [61, 71, 127] (tableau VIII).

Inoculat	Hôte	Temps d'incubation, jours (n/n <sub>o</sub> )	
		Lignée Sc237	Lignée 139H
SHa	SHa	77 ± 1 (48/48)	167 ± 1 (94/94)
SHa	Souris non transgénique	>700 (0/9)	499 ± 15 (11/11)
SHa	Souris Tg(ShaPrP)81/FVB	75 ± 2 (22/22)	110 ± 2 (19/19)
SHa	Souris Tg(ShaPrP)81/ <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>	54 ± 1 (9/9)	65 ± 1 (15/15)

Tableau VIII : Influence de « l'espèce » et de la lignée du prion sur la barrière d'espèce.

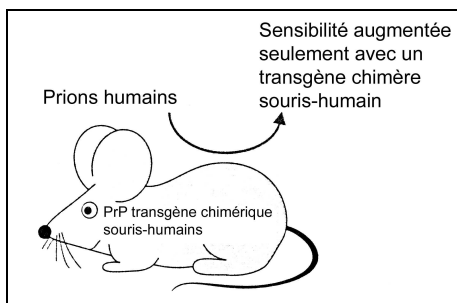
L'inoculation de ces souris Tg(ShaPrP) par des prions de Hamster de Syrie (SHa) démontre l'abrogation de la barrière d'espèce, se traduisant par un raccourcissement des temps d'incubation par rapport à des souris de lignée sauvage [106]. Le temps d'incubation après inoculation par des prions de SHa est inversement proportionnel à la quantité de SHaPrP<sup>C</sup> dans le cerveau des souris Tg(SHaPrP) [106]. Des analyses d'extraits cérébraux provenant de souris Tg(SHaPrP) malades suite à l'inoculation de prions de souris (Mo) ont montré que seuls des prions de souris étaient produits. Inversement l'inoculation de souris Tg(SHaPrP) avec des prions de SHa conduit seulement à la synthèse de prions de SHa. Bien que le niveau de synthèse de la PrP<sup>Sc</sup> paraisse être fonction du taux d'expression de la PrP<sup>C</sup> dans la souris transgène, la concentration finale en PrP<sup>Sc</sup> semble être indépendante du taux d'expression de la PrP<sup>C</sup> [106].

À l'occasion de ces expériences, on découvrit par hasard, sur des souris transgéniques non inoculées que les vieux spécimens qui portaient de nombreux transgènes de PrP développaient spontanément une ataxie, une paralysie du train postérieur et des tremblements [149]. On pouvait retrouver sur ces souris une profonde myopathie nécrosante des muscles squelettiques, une poly-neuropathie démyélinisante ainsi qu'une vacuolisation du système nerveux central. On a constaté que le développement de la maladie était dépendant de la quantité de transgène. Par exemple, les souris Tg(SHaPrP<sup>+/+</sup>)7 homozygotes pour le transgène SHaPrP développent régulièrement la maladie entre 400 et 600 jours d'âge, alors que les souris hétérozygotes Tg(SHaPrP<sup>+/0</sup>)7 développent également la maladie mais seulement après

650 jours. On peut penser que ces troubles, qui rappellent certains symptômes des ESST, sont dus à la surproduction avec accumulation de PrP hétérologue consécutive à la surexpression d'un transgène de PrP de Hamster.

### C. La protéine X

Au cours de l'étude de la transmission de prions humains à des souris transgéniques (tableau IX) [138, 139], on constate que les souris exprimant à la fois les PrP humaines et murines sont résistantes aux prions humains. Cela suggère que la MoPrP<sup>C</sup> inhibe la transmission du prion humain, c'est-à-dire la formation de nouveaux HuPrP<sup>Sc</sup>. En revanche les souris exprimant à la fois la MoPrP et la MHu2MPrP chimérique (une PrP hybride de la PrP murine et de la PrP humaine) sont sensibles aux prions humains. Les souris exprimant uniquement le transgène chimérique MHu2MPrP sont légèrement plus sensibles (Fig.13). La MoPrP<sup>C</sup> n'a qu'un effet minimal sur la formation de la MHu2MPrP<sup>Sc</sup> chimérique.



**Fig. 13 [79]**

Les souris ont une longue période d'incubation aux prions humains (>1 an). De façon étonnante, les souris transgéniques qui synthétisent la PrP humaine n'ont pas une sensibilité plus grande à l'infection.

L'expression d'un transgène de souris chimérique qui présente dans sa zone centrale une partie de la PrP humaine diminue la durée d'incubation.

Cela suggère qu'une protéine de l'hôte désignée Facteur X joue un rôle dans la conversion en interagissant avec la partie souris de la PrP chimérique

Inoculat	Hôte	Gène MoPrP	Temps d'incubation en jours	(n/n <sub>0</sub> )
sMCJ	Tg(HuPrP)	<i>Prnp</i> <sup>+/+</sup>	721	(1/10)
sMCJ	Tg(HuPrP)	<i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>	263 ± 2	(6/6)
sMCJ	Tg(MHu2M)	<i>Prnp</i> <sup>+/+</sup>	238 ± 3	(8/8)
sMCJ	Tg(MHu2M)	<i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>	191 ± 3	(10/10)

Tableau IX : Preuve de l'existence de la protéine X au cours de transmission de prions humains à des souris transgéniques

Tg(HuPrP) : Transgène de PrP humaine.  
Tg(MHu2M) : Transgène chimérique de PrP hybride entre la PrP murine et la PrP humaine.

Les expériences de transmission de prions humains aux souris transgéniques suggèrent l'existence d'une protéine X, se liant avec les PrP<sup>C</sup> avec une affinité très importante pour celle d'origine homologue. Les affinités presque similaires de la MoPrP et de la MHu2MPrP pour la protéine X s'expliquent de par la similitude de leur séquence d'acides aminés au niveau de la portion COOH-terminale.

On explique l'inhibition limitée de la transmission de prion de SHa aux souris Tg(SHaPrP)81/FVB (Tableau VIII) par une beaucoup plus grande similitude entre la SHaPrP et la MoPrP qu'entre la HuPrP et la MoPrP.

Un mécanisme de réplication du prion expliquant les cas génétiques et spontanés de ESST (fig. 14 page suivante) [39] a été mis en évidence.

En utilisant des cellules de neuroblastome de souris atteintes de tremblante, transfectées avec des gènes de PrP chimère Hu/Mo, on a pu approfondir les études sur la protéine X. On a ainsi trouvé que la substitution par un résidu humain à la position 214 ou 218 prévenait de la formation de la PrP<sup>Sc</sup> [69]. La dysmorphie ainsi produite entraînerait donc une modification au niveau du site de fixation de la protéine X, le rendant inopérant, et donc interdisant toute synthèse de PrP<sup>Sc</sup>.

Il faut ajouter à cela que la protéine X reste à ce jour encore hypothétique car son identification moléculaire n'a pas encore été réalisée.

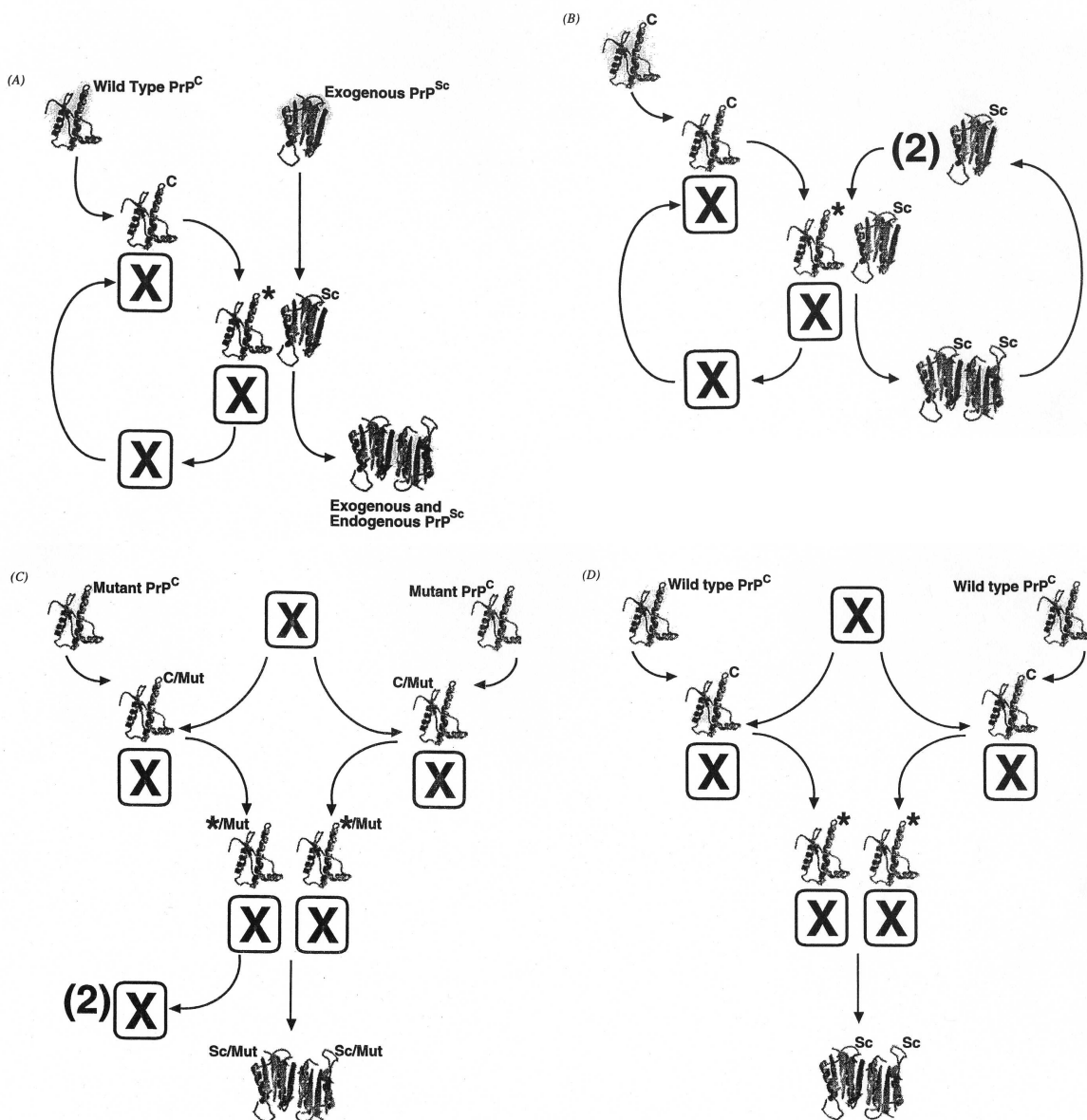


Fig. 14. [39] Synthèse de l'initiation et de la réplication de la PrP<sup>Sc</sup>.

- (A) Une PrP<sup>Sc</sup> exogène initie la synthèse en se liant au complexe protéine X/PrP<sup>C</sup>. Aidé par la protéine X et suivant le modèle de la PrP<sup>Sc</sup>, la PrP<sup>C</sup> change de conformation et forme une PrP<sup>Sc</sup> endogène. La PrP<sup>Sc</sup> ainsi formée ne peut plus se lier à la protéine X, le complexe se dissocie alors, libérant la protéine X et la PrP<sup>Sc</sup> endogène.
- (B) Un cycle de réplication de la synthèse de la PrP<sup>Sc</sup> suivant l'apparition de PrP<sup>Sc</sup> endogène. La PrP<sup>Sc</sup> se lie encore avec le complexe X/PrP<sup>C</sup> pour former un modèle activé pour la conversion de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>. Lorsque la PrP<sup>Sc</sup> est formée, la protéine X se dissocie et est recyclée. Les PrP<sup>Sc</sup> nouvellement formées peuvent alors faciliter deux cycles de réplication conduisant à une croissance exponentielle de la formation de PrP<sup>Sc</sup>.
- (C) Dans les maladies d'origine génétique et peut-être dans les maladies d'apparition spontanée par mutation de cellule somatique, la PrP<sup>C</sup> mutante peut se lier à la protéine X et former un complexe PrP<sup>C</sup>/X/PrP<sup>C</sup>/X, qui pourra alors former une PrP<sup>Sc/Mut</sup> en l'absence d'un modèle de PrP<sup>Sc</sup>. Une fois que cet événement s'est produit, la réplication suit le modèle (B).
- (D) Dans les maladies d'origine spontanée, la formation rare d'un complexe PrP<sup>C</sup>/X/PrP<sup>C</sup>/X peut conduire à la formation *de novo* de PrP<sup>Sc</sup>. Si cet événement rare arrive, la réplication pourra suivre le modèle (B).



#### D. Distribution du prion au cours de l'infection

En comparant les souris *Prnp*<sup>0/0</sup> et les souris *Prnp*<sup>+/+</sup>, on a pu mettre en évidence l'apparition progressive de PrP<sup>Sc</sup> dans le cerveau des souris *Prnp*<sup>+/+</sup> [24, 122] (tableau X) .

Temps post-inoculation	Log DL <sub>50</sub> unité/ml			
	Cerveau		Rate	
	<i>Prnp</i> <sup>+/+</sup>	<i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>	<i>Prnp</i> <sup>+/+</sup>	<i>Prnp</i> <sup>0/0</sup>
4 jours	< 1.5	2.0	5.7 ± 0.9	2.3
2 semaines	<1.5	< 1.5	6.2 ± 0.8	< 1.5
8 semaines	5.4	< 1.5	6.9 ± 1.0	< 1.5
12 semaines	6.8	< 1.5	5.9 ± 0.6	< 1.5
20 semaines	8.6	< 1.5	6.9 ± 0.6	< 1.5
23-25 semaines	8.1 ± 0.8	< 1.5	non fait	< 1.5

Tableau X : Dosage du prion dans le cerveau et la rate de souris *Prnp*<sup>+/+</sup> et *Prnp*<sup>0/0</sup>

On constate chez les souris *Prnp*<sup>0/0</sup> seulement un faible taux intracérébral quatre jours après l'inoculation intracérébrale qui devient ensuite indétectable. Cela suggère que les prions sont initialement transportés du site d'injection à la rate où ils sont rapidement dégradés. Avant ces résultats, on ne savait pas si l'infectiosité de la rate des animaux de type sauvage était due au transport des prions depuis le site d'injection ou si elle provenait d'une synthèse *in situ* des molécules infectieuses. Comme on retrouve chez les souris *Prnp*<sup>+/+</sup> un taux élevé de prion dans la rate seulement deux semaines après l'inoculation alors qu'il est indétectable dans le cerveau ainsi que dans les souris *Prnp*<sup>0/0</sup>, on peut penser que les prions sont en fait d'abord synthétisés dans la rate. Pour élucider l'énigmatique chemin suivi par l'infection, des souris exprimant de manière ectopique des PrP ont ensuite été utilisées.

## E. Expression ectopique de PrP chez des souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup>

### 1. Éclaircissement sur les cellules impliquées dans la réplication du prion au cours de l'infection par les ESST

Le fait que les souris dénuées de PrP soient incapables de répliquer le prion montre que la PrP est un facteur de l'hôte nécessaire à sa réplication ; cependant cela n'implique pas qu'elle soit suffisante, des facteurs cellulaires ou tissulaires spécifiques pouvant être également indispensables. Afin de savoir quelles sont les cellules capables de répliquer le prion ainsi que son cheminement jusqu'au système nerveux central au cours de l'infection, des souris exprimant une PrP ectopique dans différents types cellulaires ont été générées.

Il a d'abord été mis en évidence la capacité des neurones à répliquer le prion, grâce à des souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup> exprimant une PrP de Hamster sous le contrôle d'une enolase neuro-spécifique [113]. Chez ces souris, l'expression de PrP de hamster est exclusivement trouvée dans les neurones. On n'en retrouve aucune trace ni dans les cellules gliales, ni dans les cellules de la rate ou des nœuds lymphatiques. L'expérimentation montre que ces souris sont hautement sensibles à l'inoculation intracérébrale par des prions de hamster. On peut donc en conclure que les cellules non neuronales, et en particulier les astrocytes et les cellules du système lympho-réticulé, ne sont pas indispensable à la réplication du prion après inoculation intra-cérébrale.

Il a ensuite été montré l'implication des astrocytes dans la pathogénèse des ESST. Des souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup> exprimant une PrP de hamster (HaPrP) sous le contrôle d'un promoteur de protéine acide fibrillaire gliale ont été obtenues [114]. Ces souris, qui expriment la HaPrP uniquement dans les astrocytes et non dans les neurones, développent, après inoculation intra-cérébrale par des prions de hamster, une pathologie neurologique et accumulent dans leur cerveau une infectiosité et un taux de HaPrP<sup>Sc</sup> élevé.

Ces deux découvertes montrent que la réplication du prion dans les cellules du système nerveux central est l'événement cardinal de la pathogénie des ESST. Néanmoins les ESST sont le plus souvent transmises par des voies périphériques du type voie orale (au moins pour les deux maladies épidémiologiquement importantes du moment que sont l'ESB et le vMCH). Afin de démontrer le rôle du système lympho-réticulé dans l'acheminement et la réplication du prion de la lumière intestinale jusqu'au système nerveux central, on a généré des souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup> portant un transgène de PrP sous le contrôle d'un promoteur d'IRF1 [108]. Ces souris expriment des taux élevés de PrP dans les lymphocytes B et T, et un très

faible taux dans le cerveau. Après inoculation intra-péritonéale de prions de souris, on retrouve précocement des taux de prions dans la rate et le thymus comparables à ceux rencontrés lors d'infection de souris de type sauvage. En revanche on ne retrouve aucune infectiosité dans le cerveau six mois après l'inoculation ; les souris Tg ne présentent également pas de symptôme neurologique. On a également construit des souris transgéniques *Prnp*<sup>0/0</sup> portant un transgène de PrP sous le contrôle d'un promoteur de *lck* sur-exprimant la PrP dans les lymphocytes T, à un taux 100 fois supérieur à celui rencontré chez les souris sauvages [115]. En revanche, ces transgènes n'expriment aucune PrP dans les lymphocytes B. De façon étonnante ces souris sont résistantes à la tremblante, et sont incapables, après inoculation intra-péritonéale, de répliquer le prion dans la rate, le thymus ou le cerveau. Cela nous montre que l'expression de PrP n'est pas suffisante dans les lymphocytes T pour répliquer le prion, suggérant la nécessité d'un facteur spécifique type protéine X [139] qui serait absent du métabolisme des lymphocytes T. Cela met aussi en évidence l'importance des lymphocytes B dans la progression de l'infection.

## 2. Preuve transgénique de la présence de prions dans le muscle

En 1994, une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeldt–Jakob, appelée vMCJ, a été décrite. Son origine supposée (consommation de produits contenant des prions d'ESB) imposait de s'assurer que les muscles d'animaux atteints d'encéphalopathie à prion ne contenait pas d'agents infectieux. Les tests classiques (inoculation à des souris, Western blot, ELISA) n'ont jamais mis en évidence de PrP<sup>Sc</sup> dans les muscles d'animaux atteints d'ESB. Cependant Stanley B. Prusiner montra que les muscles squelettiques (surtout ceux du train postérieur) de souris inoculées par des prions de lignée Me7 ou RML (Rocky Mountain Laboratory), contenaient un titre en prions élevé [16]. Pour savoir si ces prions sont seulement accumulés par le muscle ou s'ils y sont produits *in situ*, il utilisa des souris transgéniques. Trois types de souris transgéniques exprimant des PrP ectopiques ont été produits :

- (1) Des souris PrP<sup>0/0</sup> possédant des transgènes de PrP de souris, sous la dépendance d'un promoteur qui s'exprime dans le muscle (actine), ces souris sont désignées Tg( $\alpha$ -actin-MoPrP)6906/*Prnp*<sup>0/0</sup>.
- (2) Des souris PrP<sup>0/0</sup> possédant des transgènes de PrP de hamster de Syrie, sous la dépendance d'un promoteur qui

s'exprime dans le muscle (MCK), ces souris sont désignées Tg(MCK- SHaPrP)8775/*Prnp*<sup>0/0</sup>.

- (3) Des souris *PrP*<sup>0/0</sup> possédant un transgène de PrP de souris, sous la dépendance d'un promoteur qui s'exprime dans le foie (TTR), ces souris sont désignées Tg(TTR-MoPrP)8332/*Prnp*<sup>0/0</sup>.

Toutes ces souris ont la particularité de ne produire la PrP que dans les sites d'expression du transgène (muscles pour les deux premières et seulement dans le foie pour la dernière) après inoculation intrapéritonéale ou intracérébrale. Les résultats de l'expérience montrent que les prions s'accumulent dans les muscles mais pas dans le cerveau si les PrP sont produites dans les muscles. Les quantités de prions sont très variables en fonction des muscles. Lorsque la PrP est exprimée dans le foie, on ne trouve qu'une faible quantité de prions dans le cerveau et le foie. Il existe un risque théorique que la viande issue d'animaux atteints de maladie à prion contienne des prions. Cependant les conditions expérimentales très particulières ne permettent pas d'extrapoler ces résultats à des animaux comme le mouton ou la vache ; cela souligne cependant la nécessité de poursuivre des recherches dans cette direction. Dans la plupart des pays d'Europe, toutes les carcasses qui sortent des abattoirs sont systématiquement testées pour l'ESB, donc on peut considérer que les produits à risque sont systématiquement écartés de la consommation.

### **III. Apports sur des maladies particulières**

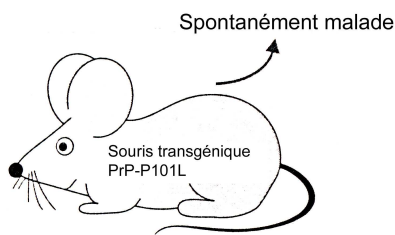
Les maladies à prions d'origine animale (l'ESB ou la tremblante) comme celles d'origine humaine sont une affaire de santé publique. Il a donc été nécessaire d'approfondir les recherches dans cette direction.

#### **A. Étude transgénique des maladies à prion humaines héréditaires**

Approximativement 10 à 20 % des maladies à prion humaines sont d'origine héréditaire avec un mode de transmission autosomique dominant. À ce jour, on a identifié une vingtaine de mutations du gène de la PrP pouvant entraîner des maladies neurodégénératives [136].

Cinq de ces mutations sont génétiquement liées aux loci contrôlant l'apparition des trois maladies à prion humaines (fMCJ, GSS et FFI) [47, 51, 53]. On a pu transmettre ces pathologies aux animaux d'expérience afin de mieux les étudier.

On a ainsi produit des souris portant un transgène de *Prnp* exprimant une proline à la place d'une leucine au niveau du codon 101, équivalent de la mutation humaine P102L responsable de la GSS (Fig. 15). Ces souris, nommées Tg(MoPrP-P101L), développent spontanément des symptômes similaires à la tremblante de la souris dès l'âge de 150 à 300 jours [66, 136].



**Fig. 15 [79]**

Les Souris transgéniques qui synthétisent la PrP mutée P101L développent spontanément une encéphalopathie spongiforme.

Dans certaines conditions la PrP<sup>Sc</sup> produite dans le cerveau de ces souris est elle-même infectieuse.

On a ensuite introduit ce transgène dans des souris *Prnp*<sup>0/0</sup>. Les souris obtenues (Tg(MoPrP-P101L)*Prnp*<sup>0/0</sup>) montrent un grand synchronisme dans l'apparition de la maladie vers 145 jours d'âge, délai qui se raccourcit à environ 85 jours pour les souris homozygotes obtenues par croisement. En revanche les souris transgéniques sur-exprimant des PrP de type sauvage de manière équivalente ne déclarent pas spontanément la maladie ; elles restent sensibles à l'inoculation par des prions murins avec une forte diminution des délais d'incubation. De plus on a montré que des extraits de cerveau provenant des souris spontanément malades ont un pouvoir infectieux entraînant par inoculation une encéphalopathie chez des souris de type sauvage. Il y a donc bien dans le cerveau des souris Tg(MoPrP-P101L)*Prnp*<sup>0/0</sup> une formation *de novo* de prions [65, 136].

On a pu ensuite étudier la transmission de prions humains provenant de malades atteints de GSS à des souris transgéniques exprimant une PrP transgène chimérique humain-souris portant la mutation P101L. On constate alors une transmission effective [139]. Des expériences similaires ont été faites avec les autres maladies à prions humaines héréditaires montrant aussi une transmission spécifique [40, 137, 139].

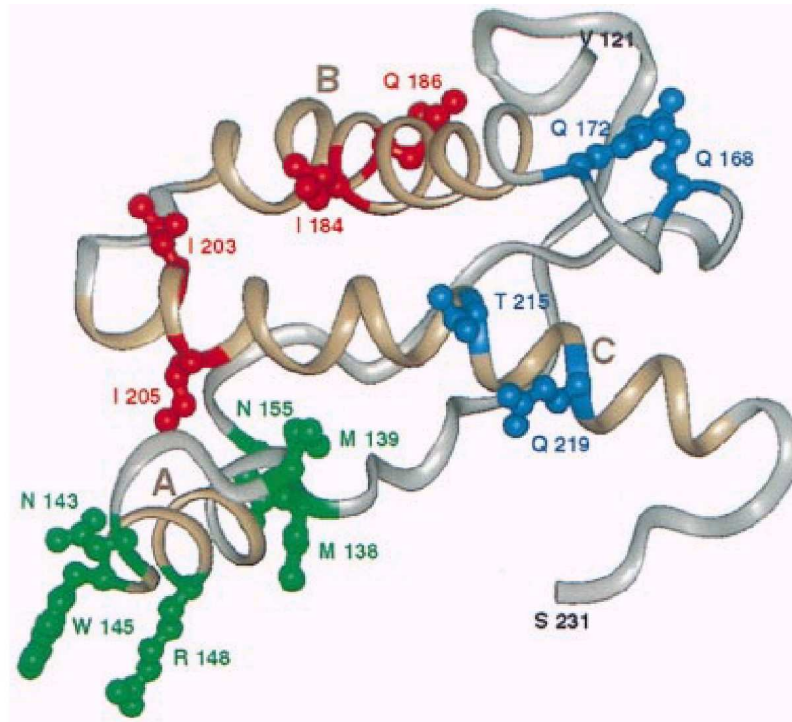
Par contre les souris transgéniques sur-exprimant une PrP mutante de souris avec un glutamate à la place de la lysine au niveau du codon 199, équivalent de la mutation du codon 200 entraînant la fMCJ(E200K), ne développent pas spontanément la maladie [136]. Il en est de même pour les souris transgéniques (Tg(MoPrP144 #) modélisant une GSS causée par une mutation au niveau du codon 145 (une tyrosine est substituée par un codon stop). Non seulement ces dernières ne développent pas de maladie spontanée, mais en plus elles sont résistantes à l'inoculation par des prions murins [92]. Cela montre les limites de ces expérimentations.

## B. Étude transgénique de l'ESB

L'ESB n'étant que très difficilement transmissible à la souris de laboratoire classique [30] et les temps d'incubation sur les bovins étant excessivement longs, il fut rapidement important de modéliser la maladie à l'aide des souris transgéniques. C'est ce que firent Telling et Prusiner en construisant à partir de souris *Prnp*<sup>0/0</sup>, des souris transgéniques exprimant des PrP bovines (Tg(BoPrP)) ainsi qu'une PrP chimérique bovin-murine (Tg(MBo2M) hybride de PrP de souris et de PrP de bovin [128]. Après inoculation par différentes lignées de prions bovins, on obtint les résultats suivants :

- les chimères bovin-murins sont insensibles aux prions bovins ;
- les souris transgéniques Tg(BoPrP)*Prnp*<sup>0/0</sup> sont sensibles à l'inoculation par les prions bovins avec une réduction moyenne des temps d'incubation ;
- les lésions du système nerveux central ainsi que les zones où se concentrent les PrP<sup>Sc</sup> sont comparables chez les souris Tg(BoPrP) et les bovins atteints d'ESB.
- après digestion par la protéinase K, la PrP<sup>Sc</sup> formée par les souris Tg(BoPrP), produit trois types de molécules de poids moléculaire 28kDa, 23kDa et 17 kDa (correspondant aux formes diglycosylée, monoglycosylée et non glycosylée de la PrP<sup>Sc</sup>), et ce avec un ratio correspondant à celui produit par les prions bovins. Il faut d'ailleurs noter que l'on retrouve un ratio quasi-identique avec les prions provenant de malades atteints de vMCJ [41] ;
- en comparant les structures des PrP chimériques MHu2M et MBo2M, on a pu mettre en évidence une région de la PrP, contenant les résidus 184,186,203 et 205 (fig.16), modulant la transformation de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> et donc aussi la transmission de la

maladie. Cela pourrait donc expliquer l'insensibilité des souris Tg(MBo2M)Prnp<sup>0/0</sup> aux prions bovins.



**Fig. 16**

**Les résidus de PrP dirigeant la transmission des prions. [128]**

La structure par RMN de la ShaPrP recombinante (90-231) montrée avec l'hypothétique épitope formé par les résidus 184,186,203 et 205 surlignés en rouge. Des résidus supplémentaires (138, 139, 143, 145, 148 et 155) qui participent peut-être au contrôle de la transmission des prions entre espèces sont représentés en vert. Les résidus 168, 172, 215 et 219 qui forment l'épitope pour la liaison à la protéine X sont montrés en bleu. L'illustration fut produite avec BIOSYM/INSIGHT II.

L'étude de l'ESB grâce aux souris transgéniques a donc apporté, outre la modélisation expérimentale de la maladie, des informations importantes sur la structure des PrP ainsi que la possibilité de titrage des prions bovins dans des délais plus rapides qu'avec des souris sauvages. Ces méthodes de dosage peuvent être d'une grande utilité en matière de santé publique, que ce soit pour la viande destinée à la consommation ou pour les produits dérivés des bovins.

**C. Preuves transgéniques de la transmission de l'ESB à l'homme**

Le nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) est apparu au cours de la dernière décennie, entraînant la mort de jeunes adultes et d'adolescents. Or la concordance épidémiologique avec l'ESB [157, 158], des électrophorèses des PrP<sup>Sc</sup> comparables [41], ainsi que la transmission de ces deux pathologies à des souris non transgéniques [22, 63] et à des

primates [77], ont conduit la communauté scientifique à penser que ces deux maladies étaient liées.

Stanley B. Prusiner a alors utilisé des souris transgéniques exprimant la PrP bovine (Tg(BoPrP)Prnp<sup>0/0</sup>) [129]. Il a inoculé ces souris avec des extraits provenant de bovins atteints d'ESB, d'humains atteints de vMCJ et de moutons atteints de tremblante.

Les souris Tg(BoPrP)Prnp<sup>0/0</sup> inoculées par les prions d'ESB ou de vMCJ développent une maladie cliniquement comparable, et ce dans des délais quasi-identiques (environ 250 jours). En revanche, ces mêmes souris contaminées par des prions de tremblante ont développé une encéphalopathie après seulement 201 jours.

La localisation des lésions du système nerveux est identique pour les souris inoculées avec du prion d'ESB ou de vMCJ, et très différente pour celles inoculées avec du prion de tremblante (fig.17).

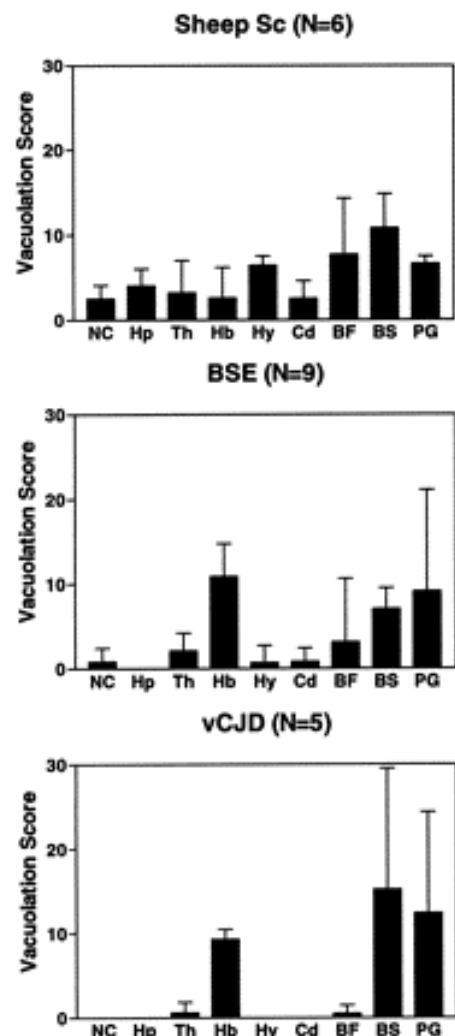
**Fig. 17. [129]**

Histogramme de vacuolisation chez des souris transgéniques Tg(BoPrP)Prnp<sup>0/0</sup> inoculées avec des prions et de tremblante (Sheep Sc), d'ESB (BSE) et de vMCJ (vCJD).

Les histogrammes de l'ESB et de la vMCJ sont très similaires et sont tous deux différents de celui de la tremblante. Les variations moyennes et standards sont indiquées. NC, néocortex ; Hb, hippocampe ; Th, thalamus ; Hb, habenula ; Hy, hypothalamus ; Cd, noyau caudal ; BF, cerveau basal ; BS, cerveau moyen ; PG, periaqueductal gray. N= nombre d'animaux analysés

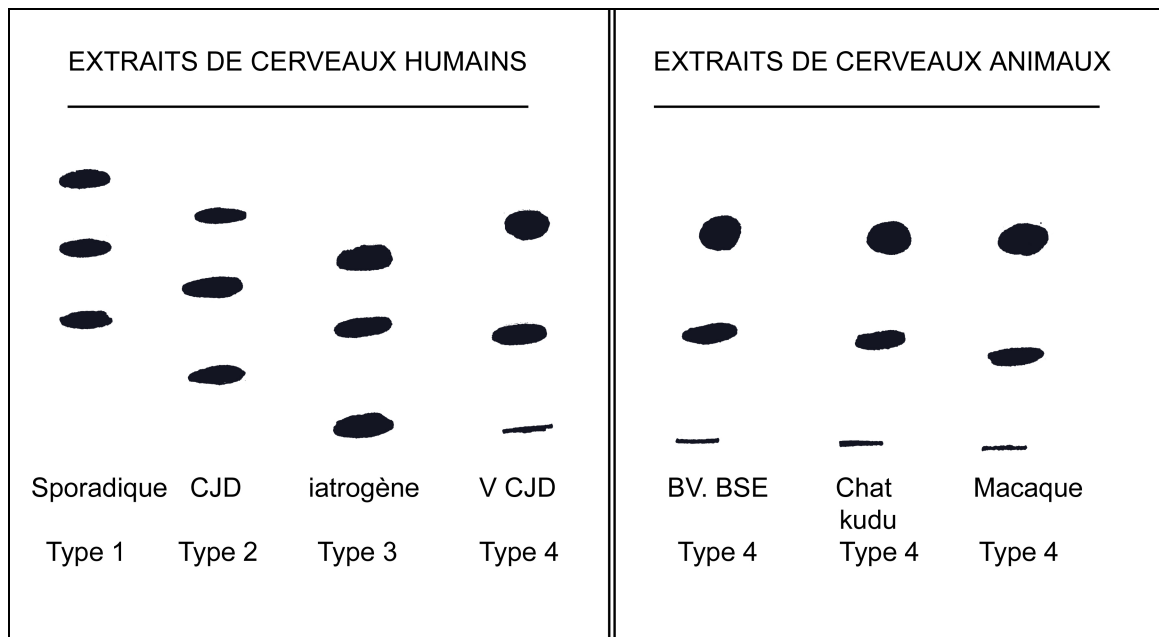
On a également constaté que les PrP<sup>Sc</sup> produites après inoculation d'ESB ou de vMCJ possèdent le même ratio des formes non, mono et diglycosylées, ce qui traduit une structure tertiaire de ces deux molécules au minimum très proche (fig. 18) [78].

On peut donc en conclure que les prions d'ESB et de vMCJ proviennent de la même lignée et que finalement la vMCJ est bien apparue à la suite de consommation humaine de produits contaminés par des prions





provenant de bovins atteints d'ESB.



**Fig. 18. [78] Tableau comparatif du ratio de forme de PrP non, mono et diglycosylées produites lors de diverses ESST humaines et animales.**

On retrouve un ratio comparable pour la vMCJ, l'ESB, le kudu du chat et les macaques contaminés par des prions d'ESB, démontrant une structure tertiaire comparable pour les PrP<sup>Sc</sup> produites au cours de ces différentes maladies et donc une origine commune.

En revanche ces expériences montrent que les prions d'ESB sont très différents de ceux de tremblante. Même si on continue de penser que l'ESB dérive de la tremblante, les détails de l'origine de cette maladie restent à déterminer.

De récentes expériences ont été conduites sur des souris transgéniques dénuées de gène *prnp* exprimant un transgène de PrP humaine codant pour un double allèle méthionine au codon 129 (Tg(HuPrP129M<sup>+/+</sup>*Prnp*<sup>0/0</sup>)-35 ou plus simplement 129MM Tg35) [42]. Le gène de PrP humaine code au niveau du codon au niveau 129 soit pour la méthionine (M), soit pour la valine (V). Ce déterminisme est une clé de la sensibilité humaine aux ESST et affecte l'âge d'apparition des troubles lors des ESST héréditaires [2]. John Collinge et son équipe ont inoculé des souris 129MM Tg35 avec différents types de prion provenant de malades atteints sMCJ, de ESB et de vMCJ. Ils ont pu constater que ces souris étaient très sensibles à la sMCJ (26/26) et légèrement sensibles à la BSE (6/49) et à la vMCJ (1/14). En revanche, les recherches biochimiques et histologiques ont montré que les souris asymptomatiques présentaient des lésions cérébrales avec accumulation de PrP<sup>Sc</sup> (14/14 pour la vMCJ et 14/49

pour la ESB). Cela remet en question la notion de barrière d'espèce qui se basait jusque là sur l'apparition de signes cliniques. De plus, cela met en évidence l'existence de porteur asymptomatique de prion qui pourrait être, dans le cas d'humains contaminés par l'ESB, la source de contamination iatrogène.

Ces expériences ont aussi montré une grande similitude histologique et biochimique des PrP<sup>Sc</sup> produites par les souris 129MM Tg35 inoculées par les prions d'ESB et de vMCJ ; confirmant ainsi la relation de cause à effet liant ses deux maladies.

Il a aussi été mis en évidence, suite à l'inoculation des souris 129MM Tg35 par des prions d'ESB, l'existence d'un phénotype de PrP<sup>Sc</sup> indifférentiable de celui produit après inoculation par des prions de sMCJ. En admettant que ce modèle murin est une sensibilité à l'ESB comparable à celle de l'espèce humaine, ce résultat implique que la contamination humaine par l'ESB pourrait entraîner des formes d'ESST en tout point comparables à la sMCJ et non à la vMCJ. Cela nous pousse donc à reconsidérer la prévalence de la contamination humaine par l'ESB.

## Conclusion

Nous avons donc vu dans ce travail un éventail des avancées permises par les souris transgéniques. Les connaissances sur les ESST ont pu ainsi grandement progresser avec en particulier la vérification de l'hypothèse du prion. Néanmoins, il reste de nombreuses incertitudes, notamment concernant le mécanisme de réplication du prion, avec l'intervention d'une hypothétique protéine X. Il faut cependant souligner les limites de la méthode, avec l'existence de résultats contradictoires. En modifiant le génome des souris, on modifie le terrain de manière non contrôlable. Les résultats de ces études doivent toujours être interprétés avec précaution.

Les connaissances actuelles de ces maladies ont permis une prévention que l'on espère efficace des risques de zoonose. Elles n'ont malheureusement pas empêché la crise qui touche le monde de l'élevage.

De l'étude complète de ces maladies, qui restent à ce jour fatales, pourra se dégager une éventuelle thérapie, et l'outil transgénique, qui offre une infinité de possibilités d'exploration, contribuera certainement à cet avènement.

## Bibliographie

1	Andreoletti (O), Lacroux (C) et al. 2002 - PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission - <i>J. Gen. Virol.</i> 83(Pt 10):2607-16.
2	Baker (HE), Poulter (M) et al. 1991 - Aminoacid polymorphism in human prion protein and age at death in inherited prion disease - <i>Lancet</i> 337:1286
3	Baker (HF), Duchen (LW) et al. 1990 - Spongiform encephalopathy transmitted experimentally from CJD and familial GSSD - <i>Brain</i> 113:1891-1909.
4	Basler (K), Oesch (B) et al. 1986 -Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. - <i>Cell</i> 46:417-428.
5	Belay (ED), 1999 - Transmissible spongiform encephalopathies in humans - <i>Annu. Rev. Microbiol.</i> 53:283-314.
6	Bellinger-Kawahara (C), Cleaver (JE) et al. 1987 - Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation - <i>J. Virol.</i> 61:159-166.
7	Bellinger-Kawahara (C), Diener (TO) et al. 1987 - Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids - <i>Virology</i> 160:271-274.
8	Bemoulli (C), Siegfried (J) et al. 1977 - Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery - <i>Lancet</i> 1:478-79
9	Bessen (RA), Kocisko (DA) et al. 1995 - Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein - <i>Nature</i> 375:698-700.
10	Bessen (RA), Marsh (RF). 1992 - Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters - <i>J. Gen. Virol.</i> 73:329-334.
11	Bessen (RA), Marsh (RF). 1994 - Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy - <i>J. Virol.</i> 68:7859-7868.
12	Bishop (JO), Smith (P). 1989 - Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA - <i>Mol. Biol. Med.</i> 6:283-298.
13	Bockman (JM), Prusiner (SB) et al. 1987 - Immunoblotting of Creutzfeldt-Jakob disease prion proteins: host species-specific epitopes - <i>Ann. Neurol.</i> 21:589-595.
14	Bolton (DC), McKinley (MP) et al. 1982 - Identification of a protein that purifies with the scrapie prion - <i>Science</i> 218:1309-1311.
15	Bolton (DC), Meyer (RK) et al. 1985 - Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein - <i>J. Virol.</i> 53(2):596-606
16	Bosque (PJ), Ryou (C) et al. 2002 - Prions in skeletal muscle - <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 99(6):3812-3817.
17	Brown (DR), Qin (K) et al. 1997 - The cellular prion protein binds copper <i>in vivo</i> - <i>Nature</i> 390:684-687.
18	Brown (DR), Schulz-Schaeffer (WJ) et al. 1997 - Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity - <i>Exp. Neurol.</i> 146:104-112.
19	Brown (P), Cathal (F) et al. 1986 - Creutzfeldt-Jakob disease: clinical analysis of a consecutive series of 230 neuropathologically verified cases - <i>Ann. Neurol.</i> 20:597-602
20	Brown (P), Gibbs (J) et al. 1994 - Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease - <i>Ann. Neurol.</i> 35:513-29
21	Brown (P), Goldfarb (LG) et al. 1992 - Phenotypic characteristics of familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with the codon 178Asn PRNP mutation - <i>Ann. Neurol.</i> 31:282-85
22	Bruce (ME), Will (RG) et al. 1997 - Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent - <i>Nature</i> 389:498-501.

23	Brugere-Picoux (J), Chatelain (J). 1989 - L'encéphalopathie spongiforme bovine - <i>Bull. Soc. Prat. de France</i> 73(2):543-563
24	Bueler (H), Aguzzi (A) et al. 1993 - Mice devoid of PrP are resistant to scrapie - <i>Cell</i> 73:1339-1347.
25	Bueler (H), Fischer (M) et al. 1992 - Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein - <i>Nature</i> , 356:577-582.
26	Carlson (GA), Ebeling (C) et al. 1994 - Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice - <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 91:5690-5694.
27	Carlson (GA), Goodman (PA) et al. 1988 - Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time - <i>Mol. Cell. Biol.</i> 8:5528-5540.
28	Carlson (GA), Kingsbury (DT) et al. 1986 - Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes - <i>Cell</i> 46:503-511.
29	Cathala (F) 1990 - Scrapie in France - <i>J. Am. Vet. Med. Assoc.</i> 196(10):1680
30	Caughey (B), Neary (K) et al. 1990 - Normal and scrapie-associated forms of prion protein differ in their sensitivities to phospholipase and proteases in intact neuroblastoma cells - <i>J. Virol.</i> 64, 1093-1101.
31	Centers for Disease Control. 1985 - Fatal degenerative neurologic disease in patients who received pituitary-derived human growth hormone - <i>Morbid. Mortal. Wkly. Rep.</i> 34:359-60, 365-66.
32	Centers for Disease Control. 1987. - Rapidly progressive dementia in a patient who received a cadaveric dura mater graft - <i>Morbid. Mortal. Wkly. Rep.</i> 36:49-50, 55.
33	Ceroni (M) 1990 - Structure of scrapie-associated protein and its relation to infectivity - <i>J. Am. Vet. Med. Assoc.</i> 196(10):1684-1685
34	Chandler (RL) 1963 - Experimental scrapie in the mouse - <i>Res. Vet. Sci.</i> 4:276-285.
35	Chatelain (J), Brugere-Picoux (J) & Laplanche (JL) 1990 - Les encéphalopathies spongiformes subaiguës des ruminants - <i>Recueil de Med. Vet</i> 166(12):1103-1110
36	Chino (F), Ohkawa (T). 1990 - Growth and spread of causative agent of Creutzfeldt-Jakob disease in intraperitoneally infected mice - <i>Jpn Journal Med. Sci. Biol.</i> 43:197-208
37	Cochius (JI), Mack (K) et al. 1990 - Creutzfeldt-Jakob disease in a recipient of human pituitary-derived gonadotropin - <i>Aust. N.Z. J. Med.</i> 20(4):592-93.
38	Cohen (FE), Pan (KM) et al. 1994 - Structural clues to prion replication - <i>Science</i> 264:530-531.
39	Cohen (FE), Prusiner (SB). 1998 - Pathologic conformations of prion proteins - <i>Annu. Rev. Biochem.</i> 67:793-819
40	Collinge (J), Palmer (MS) et al. 1995 - Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals - <i>Lancet</i> 346: 569-570
41	Collinge (J), Sidle (KC) et al. 1996 - Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD - <i>Nature</i> 383:685-690
42	Collinge (J), Wadsworth (J) et al. 2002 - BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein - <i>EMBO j.</i> 21:6358-6366
43	Collinge (J), Whittington (MA) et al. 1994 - Prion protein is necessary for normal synaptic function - <i>Nature</i> 370:295-297.
44	Cuille (J), Chelle (PL) 1938 - Transmission expérimentale de la tremblante chez la chèvre - <i>CR. Acad. Sci. Paris</i> , 208:1058-1060
45	Dickinson (AG), Meikle (VMH), Fraser (H). 1968 - Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice - <i>J. Comp. Pathol.</i> 78:293-299.

46	Diedrich (JF), Bendheim (PE) et al. 1991 - Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 88(2):375-379
47	Dlouhy (SR), Hsiao (K) et al. 1992 - Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene - <i>Nat. Genet.</i> 1:64-67.
48	Duffy (P), Wolf (J) et al. 1974 - Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease - <i>N. Engl. J. Med.</i> 290:692-93.
49	Elleman (CJ). 1984 - Attempts to establish the scrapie agent in cell lines - <i>Veterinary Research Communications</i> , 8:309-316
50	Evans (MJ), Kaufman (MH). 1981 - Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos - <i>Nature</i> 292:154-156.
51	Fischer (M), Rulicke (T) et al. 1996 - Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie - <i>EMBO J.</i> 15:1255-1264
52	Fraser (H), Dickinson (AG). 1973 - Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation - <i>J. Comp. Pathol.</i> 83:29-40.
53	Gabizon (R), Rosenmann (H) et al. 1993 - Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) - <i>Am. J. Hum. Genet.</i> 53:828-835.
54	Gajdusek (DC), Gibbs (CJ), Alpers (M). 1966 - Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees - <i>Nature</i> 209:794-796.
55	Gajdusek (DC). 1977 - Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru - <i>Science</i> , 197:943-960
56	Ghetti (B), Tagliavini (F) et al. 1989 - Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family - <i>Neurology</i> 39:1453-61
57	Gordon (JW), Scangos (GA) et al. 1980 - Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 77:7380-7384.
58	Gossen (M), Bonin (AL) et al. 1994 - Inducible gene expression Systems for higher eukaryotic cells - <i>Current Opinion in Biotechnology</i> 5:516-520.
59	Gossler (A), Doetschman (T) et al. 1986 - Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 83:9065-9069.
60	Harris (ED). 1992 - Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase - <i>J. Nutr.</i> 122:636-640.
61	Hecker (R), Taraboulos (A) et al. 1992 - Replication of distinct scrapie prion isolates is region specific in brains of transgenic mice and hamsters - <i>Genes Dev.</i> 6:1213-1228.
62	Hérault (Y), Rassoulzadegan (M) et al. 1998 - Engineering chromosomes in mice through targeted meiotic recombination (TAMERE) - <i>Nature Genetics</i> 20:381-384.
63	Hill (AF), Desbruslais ( M) et al. 1997 - The same prion strain causes vCJD and BSE - <i>Nature</i> 389:448-450.
64	Hsiao (K), Baker (HF) et al. 1989 - Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome - <i>Nature</i> 338:342-345
65	Hsiao (KK), Groth (D) et al. 1994 - Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 91:9126-30
66	Hsiao (KK), Scott (M) et al. 1990 - Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein - <i>Science</i> 250:1587-90
67	Huang (Z)., Prusiner (SB) & Cohen (FE). 1996 - Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment - <i>Fold. Des.</i> 1:13-19.
68	Jaenisch (R). 1976 - Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus - <i>Proc. Natl. Aca. Sci. USA</i> 73:1260-1264.

69	Kaneko (K), Zulianello (L) et al. 1997 - Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 94:10069-10074.
70	Kimberlin (RH) and Walker (C). 1977 - Characteristics of a Short Incubation Model of Scrapie in the Golden Hamster - <i>J. Gen. Virol.</i> 34:295-304.
71	Kimberlin (RH), Walker (CA) & Fraser (H). 1989 - The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice - <i>J. Gen. Virol.</i> 70:2017-2025.
72	Kimberlin (RH). 1982 <i>Trends Biochem. Sci.</i> 7:392-394.
73	Kimberlin (RH). 1990 - Scrapie and possible relationships with viroids - <i>Sem. Virol.</i> 1:153-162.
74	Kingsbury (DT), Kasper (KC) et al. 1983 - Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice - <i>J. Immunol.</i> 131:491-496.
75	Lapras (J). 1983 - Encéphalopathies spongiformes de l'homme - <i>Point Vet.</i> 22(33):743-749
76	Lapras (J). 1990 - Les affections neurologiques dites à virus lents chez l'homme - <i>Sci. Vet. Med. Comp.</i> 92(4):119-127
77	Lasmezas (CI), Deslys (JP) et al. 1996 - BSE transmission to macaques - <i>Nature</i> 381:743-744
78	Lasmezas (CI), Fournier (JG) et al. 2001 - Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 98:4142-7
79	Lehmann (S). 1996 - Le rôle de la protéine du prion dans les encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines - <i>Médecine Sciences</i> 12(8-9):949-58.
80	Lewandoski (M), Martin (GR). 1997 - Cre-mediated chromosome loss in mice - <i>Nature Genetics</i> 17:223-225.
81	Lledo (PM), Tremblay (P) et al. 1996 - Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus - <i>Proc. Natl Acad. Sci. USA</i> 93:2403-2407.
82	Lugaresi (E), Medori (R) et al. 1986 - Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of the thalamic nuclei - <i>N. Engl. J. Med.</i> 315:997-1003.
83	Marsh (RF) & Kimberlin (RH). 1975 - Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis - <i>J. Infect. Dis.</i> 131:104-110.
84	Martin (G). 1981 - Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 78:7634-7638.
85	Meiner (Z), Gabizon (R), Prusiner (SB). 1997 - Familial Creutzfeldt-Jakob disease, codon 200 prion disease in Libyan Jews - <i>Medicine</i> 76:227-37.
86	Meisler (MH). 1992 - Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic mice - <i>Trends in Genetics</i> 8:341-348.
87	Metzger (D), Feil (R). 1999 - Engineering the mouse genome by site-specific recombination - <i>Curr Opin Biotechnol</i> 10:470-476.
88	Michel (B) & Tamalet (J). 1987 - Les prions - <i>Médecine et Maladies Infectieuses</i> H 626-633
89	Millet (A), 1998 - Des souris presque sur mesure. Un outil expérimental apparemment idéal : les souris Knock-out - <i>La recherche</i> 311(52-53)
90	Minery (S), Arranz (JM) et al. 2002 - Utilisation de la génétique pour éradiquer la tremblante dans les élevages de brebis laitières des Pyrénées-Atlantiques - <i>Renc. Rech. Ruminants</i> 9:93
91	Moore (RC), Hope (J) et al. 1998 - Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent - <i>Nat. Genet.</i> 18:118-125.

92	Muramoto (T), DeArmond (SJ) et al. 1997 - Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an $\alpha$ -helix - <i>Nat. Med.</i> 3:750-5
93	Muramoto (T), Scott (M) et al. 1996 - Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 93:15457-15462.
94	Nitrini (R), Rosemberg (S) et al. 1997 - Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation - <i>Ann. Neurol.</i> 42:138-46.
95	Palhière (I), Elsen (JM) et al. 2002 - Génétique de la résistance à la tremblante des ovins : état des connaissances et application pour l'amélioration génétique des populations ovines françaises - <i>Renc. Rech. Ruminants</i> 9:3
96	Palmiter (RD), Brinster (RL) et al. 1982 - Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes - <i>Nature</i> , 300:611-615.
97	Pan (K), Baldwin (MA) et al. 1993 - Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 90:10962-6.
98	Parodi (AL), Brugere-Picoux (J), Chatelain (J) & Laplanche (JL). 1990 - L'encéphalopathie spongiforme bovine : une nouvelle entité provoquée par un agent transmissible non conventionnel - <i>Bull. Acad. Nat. Med.</i> 174(6):731-741.
99	Pattison (IH). 1990 - Scrapie agent in muscle - <i>Vet. Rec.</i> 126(3):68
100	Pattison, (IH). 1965 in : - Slow, Latent and Temperate Virus Infections, NINDB Monograph 2 - eds. Gajdusek (DC), Gibbs (CJ), Jr. & Alpers (MP) (U.S. Gov. Printing Office, Washington, DC), pp. 249-257.
101	Pocchiari (M). 1990 - Methods for inactivating experimentally induced scrapie in hamster tissues - <i>J.A.V.M.A.</i> 196(10):1683-1684
102	Poulter (M), Baker (HF) et al. 1992 - Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies - <i>Brain</i> 115:675-685.
103	Prusiner (SB), Bolton (DC) et al. 1982 - Further purification and characterization of scrapie prions - <i>Biochemistry</i> 21:6942-6950.
104	Prusiner (SB), Groth (D) et al. 1993 - Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 90:10608-10612.
105	Prusiner (SB), Groth (DF) et al. 1984 - Purification and structural studies of a major scrapie prion protein - <i>Cell</i> 38:127-134.
106	Prusiner (SB), Scott (M) et al. 1990 - Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication - <i>Cell</i> 63:673-686.
107	Prusiner (SB), Torchia (M) & Westaway (D). 1991 - Molecular biology and genetics of prions. Implications for sheep scrapie, "Mad cows" and the BSE epidemic - <i>Cornell Vet</i> 81(2): 85-101
108	Prusiner (SB). 1982 - Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie - <i>Science</i> 216:136-144.
109	Prusiner (SB). 1982 - Novel Proteinaceous infectious particles cause serapie - <i>Science</i> 216:136-144
110	Prusiner (SB). 1991 - Molecular biology of prion diseases - <i>Science</i> 252:1515-1522.
111	Prusiner (SB). 1997 - Prion diseases and the BSE crisis - <i>Science</i> 278:245-251.
112	Prusiner (SB). 1998 - Prions - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 95:13363-13383
113	Race (RE), Priola (SA) et al. 1995 - Neuron specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent - <i>Neuron</i> 15:1183-91.
114	Raeber (AJ), Race (RE) et al. 1997 - Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie - <i>EMBO J.</i> 16:6057-65.



115	Raeber (AJ), Sailer (A) et al. 1999 - Ectopic expression of prion protein (PrP) in T lymphocytes or hepatocytes of PrP knockout mice is insufficient to sustain prion replication - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 96 :3987-3992
116	Reibel (S). 1994 - Encéphalopathie spongiforme bovine. Epidémiologie et implications - Paris : <i>Polytechnica</i> .
117	Richardson (EP), Masters (CL). 1995 - The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system - <i>Brain Pathol.</i> 5:33-41.
118	Ridley (RM) & Baker (HF). 1996 - To what extent is strain variation evidence for an independent genome in the agent of the transmissible spongiform encephalopathies? - <i>Neurodegeneration</i> 5:219-231.
119	Rijkers (T), Peetz (A), Rütther (U). 1994 - Insertional mutagenesis in transgenic mice - <i>Transgenic Research</i> 3:203-215
120	Robertson (E), Bradley (A) et al. 1986 - Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector - <i>Nature</i> 323:445-448.
121	Sabatier (P). 1995 - L'encéphalopathie spongiforme bovine : particularités épidémiologiques, étiopathogéniques et conséquences - <i>E.N.V.T.</i> Thèse : 95-TOU 3-4008
122	Sailer (A), Büeler (H) et al. 1994 - No propagation of prions in mice devoid of PrP - <i>Cell</i> 77:967-968.
123	Savey (M). 1991 - Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles - <i>Point Vet</i> , 22, 133: 703-711
124	Schelcher (F), Delverdier (M), Cabanie (P), Valarcher (JF) & Espinasse (J). 1991 - La tremblante des ovins et des caprins : diagnostic, contrôle en élevage - <i>Point Vet</i> , 22, 133: 713-719
125	Scott (M), Foster (D) et al. 1989 - Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques - <i>Cell</i> 59:847-857.
126	Scott (M), Groth (D) et al. 1993 - Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes - <i>Cell</i> 73:979-988.
127	Scott (MR), Groth (D) et al. 1997 - Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein - <i>J. Virol.</i> 71:9032-9044.
128	Scott (MR), Safar (J) et al. 1997 - Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 94:14279-14284
129	Scott (MR), Will (R) et al. 1999 - Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.</i> 96:15137-42.
130	Selbert (S), Bentley (DJ) et al. 1998 - Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland - <i>Transgenic Research</i> 7:387-396.
131	Sigurdsson (B). 1954 - Rida, a chronic encephalitis of sheep - <i>British Veterinary Journal</i> 110:341-354.
132	Southwood (R). 1989 - Report on BSE - <i>Vet. Rec.</i> 124:405-406
133	Stern (K). 1939 - Severe dementia associated with bilateral symmetrical degeneration of the thalamus. <i>Brain</i> 62:157-71.
134	Tanimoto (K), Liu (Q) et al. 1999 - Effects of altered gene order or orientation of the locus control region on human beta-globin gene expression in mice - <i>Nature</i> , 398:344-348.
135	Taylor (DM). 1989 - Scrapie agent decontamination : implications for the bovine spongiform encephalopathy - <i>Vet. Rec.</i> 24:291-292
136	Telling (GC), Haga (T) et al. 1996 - Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration transgenic mice - <i>Genes Dev</i> 10:1736-50
137	Telling (GC), Parchi (P) et al. 1996 - Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity - <i>Science</i> 274:2079-82.

138	Telling (GC), Scott (M) et al. 1994 - Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 91:9936-9940.
139	Telling (GC), Scott (M) et al. 1995 - Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein - <i>Cell</i> 83:79-90.
140	Telling, (GC). 2000 - Prion protein genes and prion diseases: studies in transgenic mice - <i>Neuropath. Appl. Neurobiol.</i> 26:209-220.
141	Thadani (V), Penar (PL) et al. 1988 - Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from cadaveric dura mater graft - <i>J. Neurosurg.</i> 69:766-69.
142	Tobler (I), Gaus (SE) et al. 1996 - Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein - <i>Nature</i> 380:639-642.
143	Tomizuka (K), Yoshida (H) et al. 1997 - Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice - <i>Nature Genetics</i> 16:133-143.
144	Tsukui (T), Kanegae (Y) et al. 1996 - Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs - <i>Nature Biotechnology</i> 14:982-985.
145	Wang (ZQ), Kiefer (F) et al. 1997- Generation and completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection - <i>Mech. Dev.</i> 62:137-145.
146	Weissmann (C), Fischer (M) et al. 1998 - The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies - <i>Int J Exp Pathol</i> 77(6):283-93
147	Welch (PJ), Barber (JR), Wong-Staal (F). 1998 - Expression of ribozymes in gene transfer Systems to modulate target RNA levels - <i>Curr. Opin. Biotechnol.</i> 9:486-496.
148	Wells (GA), Scott (AC) et al. 1987 - A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle - <i>Vet. Rec.</i> 121:419-420.
149	Westaway (D), Cooper (C) et al. 1994 - Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene - <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 91:6418-6422.
150	Westaway (D), Goodman (PA) et al. 1987 - Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice - <i>Cell</i> 51:651-662.
151	Westaway (D), Mirenda (CA) et al. 1991 - Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice - <i>Neuron.</i> 7:59-68.
152	Whitelaw (CB), Springbett (AJ) et al. 1993 - The majority of G0 transgenic mice are derived from mosaic embryos. <i>Transgenic Research</i> 2:29-32.
153	Whittington (MA), Sidle (KC) et al. 1995 - Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein - <i>Nature Genet.</i> 9:197-201.
154	Wientjens (DP), Davanipour (Z) et al. 1996 - Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies - <i>Neurology</i> 46:1287-91.
155	Wilesmith (JW), Ryan (JB), Atkinson (MJ). 1991 - Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin - <i>Vet. Rec.</i> 128:199-203.
156	Wilesmith (JW), Wells (GA) et al. 1988 - Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies - <i>Vet. Rec.</i> 123:638-644.
157	Will (RG), Cousens (SN) et al. 1999 - Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease - <i>Lancet</i> 353:939.
158	Will (RG), Ironside (JW) et al. 1996 - A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK - <i>Lancet</i> 347:921-925.
159	Will (RG), Matthews (WB). 1982 - Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease - <i>J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry</i> 45(3):235-8.
160	Zeidler (M), Stewart (GE) et al. 1997 - New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests - <i>Lancet</i> 350:903-7.

## Tableaux

<b>Tableau I</b> : Les différentes ESST .....	15
<b>Tableau II</b> : Résistance aux agents physiques de l'ATNC .....	17
<b>Tableau III</b> : Résistance aux agents chimiques de l'ATNC .....	19
<b>Tableau IV</b> : Relations entre la concentration en protéinase, le temps d'exposition et la proportion d'agent détruit .....	21
<b>Tableau V</b> : Les 3 hypothèses sur la structure de l'agent transmissible des ESST .....	22
<b>Tableau VI</b> : Souches de prion distinctes générées chez l'humain par des maladies à prions d'origine génétique et leur transmission à des souris transgéniques .....	44
<b>Tableau VII</b> : Susceptibilité et résistance de souris transgènes aux mini-prions artificiels .....	45
<b>Tableau VIII</b> : Influence de « l'espèce » et de la lignée du prion sur la barrière d'espèce .....	49
<b>Tableau IX</b> : Preuve de l'existence de la protéine X au cours de transmission de prions humains à des souris transgéniques .....	51
<b>Tableau X</b> : Dosage du prion dans le cerveau et la rate de souris <i>Prnp</i> <sup>+/+</sup> et <i>Prnp</i> <sup>0/0</sup> .....	53

## Figures

<b>Fig. 1.</b> Pourcentage de troupeaux laitiers ayant présenté au moins un cas d'ESB de 1986 à 1990.....	13
<b>Fig. 2.</b> Les isoformes de la protéine du prion.....	24
<b>Fig. 3.</b> Structure obtenue par RMN d'une PrP(90-231) recombinante de hamster de Syrie .....	26
<b>Fig. 4.</b> Caractéristique de structure de la protéine du prion .....	27
<b>Fig. 5.</b> Modèle possible de structure tertiaire de PrP <sup>Sc</sup> humaine.....	28
<b>Fig. 6.</b> Hypothèse de propagation du prion.....	31
<b>Fig. 7a et 7b.</b> La réplication du prion .....	32
<b>Fig. 8.</b> Le système de recombinaison Cre-lox site-spécifique.....	36
<b>Fig. 9.</b> Produire des souris « knock-out » .....	37
<b>Fig. 10.</b> Les souris transgéniques dénuées de PrP knock-out .....	42
<b>Fig. 11.</b> Résistance des souris Knock-out à la PrP <sup>Sc</sup> .....	42
<b>Fig. 12.</b> souris transgéniques chimères .....	43
<b>Fig. 13.</b> Les souris ont une longue période d'incubation aux prions humains .....	50
<b>Fig. 14.</b> Synthèse de l'initiation et de la réplication de la PrP <sup>Sc</sup> .....	52
<b>Fig. 15.</b> Les souris transgéniques qui synthétisent la PrP mutée P101L.....	57
<b>Fig. 16.</b> Les résidus de PrP dirigeant la transmission des prions .....	58
<b>Fig. 17.</b> Histogramme de vacuolisation chez des souris transgéniques.....	60
<b>Fig. 18.</b> Tableau comparatif du ratio de forme de PrP non, mono et diglycosylées produites lors de diverses ESST humaines et animales.....	61

**NOM : STIEGLER**  
**PRÉNOM : Frédéric**

**Titre de la thèse : INTÉRÊT DE L'UTILISATION DES SOURIS  
TRANSGÉNIQUES DANS L'ÉTUDE DES ESST**

---

**RÉSUMÉ :**

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles telles la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou l'encéphalopathie spongiforme bovine sont des pathologies fatales et transmissibles, en particulier à l'homme. Son agent infectieux nommé « prion » par Stanley B. Prusiner dès 1982 est longtemps passé au travers des différents moyens d'exploration classiques. Dans ce travail nous nous attachons à montrer les différentes avancées que l'utilisation des souris transgéniques ont apporté à l'étude du prion et des différentes ESST.

---

The Transmissible Subacute Spongiform Encephalopathies such as Creutzfeldt-Jakob's disease or Bovine Spongiform Encephalopathies are fatal pathologies that can be transmitted to man. The infecting agent, which was first called « prion » by Stanley B. Prusiner in 1982, has for a long time been just a working hypothesis with the classical research methods.

The new advances in the study of prion and the different prion diseases made by using transgenic mice, will be shown in this thesis.

---

**MOTS CLÉS :**

SOURIS TRANSGENIQUES – PRION – ESST – PRP – ESB – TREMBLANTE – TRANSGENESE.